

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914

N° 5

CONTRIBUTION
à
L'ETUDE DU KÉPHIR

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université
de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le 2 Avril 1914

PAR

Jean-Claude JANDIN

Pharmacien de 1^{re} Classe

JURY : MM. GRIMBERT, Président ; PERROT, Professeur ;
LUTZ, Agrégé.

LE HAVRE

Imprimerie EUGÈNE GODEFROY & C^{ie}, 21, Quai d'Orléans

1914

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1913-1914

N° 5

CONTRIBUTION à L'ETUDE DU KÉPHIR

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université
de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le 2 Avril 1914

PAR

Jean-Claude JANDIN

Pharmacien de 1^{re} Classe

JURY : MM. GRIMBERT, Président ; PERROT, Professeur ;
LUTZ, Agrégé.

LE HAVRE

Imprimerie EUGÈNE GODEFROY & C^{ie}, 21, Quai d'Orléans

1914



Personnel de l'Ecole Supérieure de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. GAUTIER, Directeur, *,  I.
BOURQUELOT, Assesseur, *,  I.
E. MUSSON, Secrétaire, *,  I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut,	
O. *,  I.....	Botanique générale.
VILLIERS,  *,  I.....	Chimie analytique.
BOURQUELOT, *,  I.....	Pharmacie galénique.
GAUTIER, *,  I.....	Chimie minérale.
RADAIS, *,  I.....	Cryptogamie.
BÉHAL, O. *,  I.....	Chimie organique.
PERROT, *,  I.....	Matière médicale.
COUTIERE, *,  I.....	Zoologie.
BERTHELOT,  I.....	Physique.
GRIMBERT, *,  I.....	Chimie biologique.
MOUREU, Membre de l'Institut,	
*,   I.....	Pharmacie chimique.
LEBEAU,  I.....	Toxicologie.
DELÉPINE,  I.....	Hydrologie et Hygiène.

Directeur honoraire : M. GUIGNARD, O. *,  I.

Professeurs honoraires :

MM. JUNGFLEISCH, O. *,  I. et BOUCHARDAT, O. *,  I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET,  I.		MM. GUÉRIN,  I.
VALEUR,  I.		GUÉGUEN,  I.
BOUGAULT,  I.		LUTZ,  I.
TASSILLY,  I.		HÉRISSEY,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. GUERBET,  I.....	Minéralogie.
HONNORAT,  I.....	Législation et déontologie pharmaceutiques.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ,  I.....	Chimie générale.
COUSIN,  I.....	Chimie analytique.
SOUÈGES,  A....	Micrographie.
MOURLOT,  I.....	Physique.
BARTHELAT,  I.....	Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER,  I.

Bibliothécaire en chef : M. DORVEAUX,  I.

A la mémoire de mon Père,



A ma Mère,



A ma Femme,



A mes Enfants,



A ma Famille.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE,

MONSIEUR LE DOCTEUR L. GRIMBERT

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE

A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

INTRODUCTION

Contribution à l'étude du Képhir

PAR

Jean-Claude JANDIN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

En France, tous les pharmaciens qui, comme nous, ont eu l'occasion d'utiliser les différents produits, qui leur sont offerts pour préparer le Képhir, soit qu'ils emploient les grains, les poudres, les comprimés ou même les bouillons, ont certainement été frappés des résultats obtenus, même avec des semences de même origine et en s'entourant de toutes les précautions nécessaires.

Si certaines boissons ont les qualités appétissantes que doit avoir le Képhir bien préparé, d'autres au contraire sont amères, plus ou moins liquides et d'odeur parfois franchement désagréables.

Si l'on songe que la transformation du lait en Képhir résulte d'une fermentation purement microbienne, que le nombre des infiniment petits pouvant vivre dans le lait est innombrable, on doit se demander si les déboires obtenus ne sont pas une conséquence de l'envahissement des semences employées par des germes tout à fait étrangers à ceux qui existent dans le vrai Képhir du Caucase.

Mais pour connaître les germes inutiles et les éliminer sûrement, il paraît avant tout nécessaire de préciser quels sont les germes spécifiques du vrai Képhir. Les travaux des nombreux auteurs qui se sont occupés de l'étude de cette boisson sont assez contradictoires et n'ont pas établi d'une façon sûre quels sont les germes indispensables pour former le grain et leur rôle principal. Il nous a paru intéressant de tenter une série d'expériences pour préciser quelques points de ce problème très complexe.

Avant d'entrer dans le vif de la question, nous avons cru bon de faire l'historique du Képhir et d'exposer brièvement

les travaux s'y rapportant. Les différents germes isolés, nous étudierons leur morphologie et chercherons à préciser leur rôle dans les fermentations ou dans les sécrétions des diverses diastases qui transforment le lait en Képhir.

Nous terminerons par une comparaison entre le Képhir et le lait digéré in vitro par les extraits d'organes.

Nous sommes heureux d'exprimer ici notre profonde et respectueuse reconnaissance :

A notre Président de thèse, M. le Professeur Grimbert, qui nous a si aimablement reçu dans son laboratoire et a été pour nous un guide aussi obligeant qu'éclairé ;

A M. le Professeur Perrot, dont l'accueil sympathique nous a si profondément touché ;

A M. le Professeur agrégé Lutz, qui nous a permis de mettre à contribution ses connaissances si appréciées.

Et certain que nous trouverons chez nos juges la même bienveillance qui nous a été témoignée par nos maîtres, nous les remercions bien sincèrement de l'honneur qu'ils nous font de faire partie de notre Jury.

HISTORIQUE

Le Képhir ou Kéfir est la boisson populaire des habitants du Caucase. C'est un liquide gazeux de saveur légèrement piquante, fraîche et agréable, préparé depuis longtemps dans tous les ménages de ces contrées avec du lait de vache, de chèvre ou de brebis, au moyen d'un ferment spécial : le grain de Képhir.

L'origine de cette semence n'est pas connue. La légende raconte que Mahomet donna les premiers grains à ses adeptes et que ces grains devaient perdre leurs propriétés si le secret de la préparation était livré aux étrangers.

Ces grains de consistance demi-solide varient de la grosseur d'une tête d'épingle à celle d'une noisette, de couleur plus ou moins jaunâtre et d'odeur légèrement butyrique ; ils sont mamelonnés à leur surface ce qui les fait ressembler à des têtes de choux-fleurs. Ils se gonflent dans l'eau et surtout dans le lait. Dans les pays d'origine, les indigènes préparent le Képhir avec le lait cru, mais en raison des nombreux ferments qui souillent toujours le lait et vu les difficultés de se procurer du lait aseptique, on préfère, en France, utiliser du lait stérilisé à l'autoclave à 115° ou au moins maintenu quelques minutes à l'ébullition.

Pour utiliser les grains de Képhir, on les met en contact avec 15 ou 20 fois leur volume de lait pendant 24 heures à une température de 15 à 20°. On sépare ensuite les grains à l'aide d'un tamis, on les lave pour les remettre en contact avec du nouveau lait. Quant au premier lait, il est divisé dans des flacons bouchés, où la fermentation se développe et au bout de 2 ou 3 jours il donne une boisson mousseuse. La durée de la fermentation modifie rapidement les qualités physiques et organoleptiques du Képhir. Le volume de ces grains ainsi traités augmente assez rapidement, d'après Bary, il peut être doublé en quelques semaines. (Bb. 3).

Quand on ne veut préparer que de petites quantités de Képhir et que l'on ne tient pas à nourrir la semence, on peut mettre le lait stérile dans des bouteilles aseptiques et l'ensemencer avec les grains, que l'on a eu soin de diviser finement avec du sucre de lait stérile.

Le secret de la préparation du Képhir fut gardé pendant longtemps, ce n'est guère qu'en 1866 que la Société Médicale du Caucase l'a fait connaître en même temps qu'elle propage les propriétés bienfaisantes de ce produit.

En France, les premiers essais thérapeutiques du Képhir furent tentés par les Professeurs Dujardin-Beaumetz et Hayem, qui mirent en évidence ses propriétés diététiques et médicamenteuses, liées à sa constitution chimique. Depuis, la consommation de ce produit a grandi de jour en jour, mais c'est surtout depuis les communications de M. Metchnikoff sur la bactériologie lactique qu'il est prescrit par le Corps médical.

A l'heure actuelle, il est encore l'apanage de quelques laboratoires, qui le livrent directement au consommateur, ou spécialisent des ferments qui permettent la préparation chez soi.

Cet aliment-médicament a été l'objet de nombreux travaux chimiques et bactériologiques dont nous allons résumer les plus connus.

Hammarsten, vers 1880, signale dans le Képhir la présence de l'alcool et des acides lactique et carbonique, d'après lui la caséine n'est pas atteinte mais seulement finement coagulée. (Bb. 39).

Kern, en 1881, fait l'examen microscopique des grains de Képhir, y trouve des microbes variés dont deux surtout attirent son attention : une levure et un bacille.

La levure peu abondante ressemble aux levures ordinaires.

La bactérie est formée de petits bâtonnets souvent renflés à une ou aux deux extrémités, Kern qui avait cru être en présence de spores, a donné à ce bacille le nom de *Dispora Caucasica*.

Cet auteur attribue un rôle prépondérant à la levure, mais considère comme indispensable la présence du bacille, sans cependant expliquer le phénomène des fermentations signalées par Hammarsten. (Bb. 47).

En 1889, Bejerinck attribue à la levure la propriété de faire subir au sucre de lait une véritable fermentation alcoolique et explique ainsi la présence de l'alcool dans le Képhir ; quant à l'acide lactique, il en impute la paternité aux divers bacilles rencontrés et en particulier au *Dispora Caucasica* signalé par Kern. (Bb. 6).

Freudenreich, en 1897, en pratiquant des ensemencements sur gélose au sérum de lait, avec du Képhir préparé avec du lait stérilisé, a réussi à distinguer et à étudier quatre espèces de germes : une levure, deux streptocoques *a* et *b* et un bacille.

La levure, qu'il appelle *Saccharomyces Kephir* se développe bien dans le bouillon de viande et le moût de bière où elle ne produit qu'une fermentation très faible. Elle pousse bien dans les milieux glucosés ou saccharosés et donne une fermentation active. Ensemencée dans le lait, elle lui donne une saveur spéciale rappelant celle du Képhir, mais aucune

fermentation ne se produit. Elle ne résiste pas à une température de plus de 55° et est facilement tuée par les antiseptiques.

Au streptocoque « *a* » il attribue les fins flocons du coagulum du Képhir, il caille le lait à 35° en 48 heures et résiste mieux que le *Saccharomyces* à l'action de la chaleur et des antiseptiques. Le streptocoque « *b* » ne coagule pas le lait quoique produisant des acides lactique et carbonique mais offre plus de résistance que son congénère à la chaleur et aux antiseptiques.

Le *Bacillus Caucasicus* acidifie, mais ne coagule pas le lait. Freudenreich a constaté les renflements des extrémités signalés par Kern chez le *Dispora Caucasica*, mais comme il ne les considère pas comme des spores, il a donné à ce bacille le nom de *Bacillus Caucasicus*. Il est très sensible à l'action des antiseptiques et de la chaleur.

Poussant plus loin ses recherches, Freudenreich a cherché à faire la synthèse du Képhir, en ensemençant en même temps les quatre germes dans du lait, après les avoir acclimatés les uns aux autres par des cultures sur gélose. L'auteur ne semble pas avoir été très satisfait de ses expériences, mais des insuccès se rencontrent souvent même quand on opère directement au moyen des grains de Képhir. (Bb. 27).

En 1898, Jorgensen annonçait que les grains de Képhir russe contenaient un *Saccharomyces* véritable faisant fermenter le sucre de lait. (Bb. 45).

Touschinsky et Sonnerat ont publié des analyses de Képhir en les accompagnant de celle du lait correspondant.

	PAR KILOG.		PAR KILOG.	
	Lait	Képhir	Lait	Képhir
Matière grasse.....	38	20	26,60	24,70
Matière albuminoïde..	48	38	34,60	31,20
Sucre de lait	41	20	41,20	14,60
Acide lactique	—	9	—	7,60
Alcool.....	—	8	—	9,80
Eaux et sels.....	873	905	900,60	922,10
	Touschinsky (Bb. 75)		Sonnerat (Bb. 73)	

Si les auteurs ne sont pas d'accord sur la transformation des matières grasse et albuminoïde, ils constatent tous les deux une fermentation lactique et alcoolique dont les résultats

sont assez concordants, mais ils n'ont pas toutefois attribué à chaque germe le rôle qui lui est propre.

En 1910, Van O'Tunmann fait l'étude micrographique des grains de Képhir ; la partie principale de la semence est formée du *Saccharomyces Kephir* et du *Bacillus Caucasicus* (*Dispora Caucasica*), tandis que les streptocoques sont relégués au deuxième plan. Il ne trouve pas de différence, à l'examen microscopique, entre les cellules de la levure du Képhir et celle du *Saccharomyces cerevisiaë*.

L'auteur cherche également à établir la composition chimique de l'enveloppe des germes et des zooglées qui peuvent les entourer. La membrane du *Saccharomyces* renferme de la chitine, mais pas de cellulose, la présence des matières grasses n'a pas nettement été établie. L'enveloppe du *Bacillus Caucasicus* ne donne pas la réaction de la chitine et ne renferme pas non plus de cellulose. La composition des zooglées qui englobent les streptocoques n'a pu être déterminée.

Tunmann a trouvé dans les grains de Képhir des traces d'un sucre qu'il n'a pu définir, faute de matière première ; la présence de cet élément s'explique facilement par le milieu lactosé qui a servi à nourrir la semence analysée.

Il appelle également l'attention sur les souillures que l'on rencontre fréquemment dans les semences de Képhir, tels que mites, poils d'animaux, ainsi que des fibres de coton et de laine. (Bb. 77).

Grinzberg publie, en Décembre 1910, ses recherches sur les actions chimiques des fermentations du Koumys et du Képhir.

Il signale dans ces deux produits les fermentations lactique et alcoolique. La proportion de sucre transformée en alcool est plus élevée que celle convertie en acide lactique. La caséine perd presque toute sa chaux et son acide phosphorique, il se forme des produits d'hydrolyse de l'albumine.

Les phénomènes sont moins accentués dans le Képhir que dans le Koumys, la moitié du sucre seulement disparaît, l'alcool n'atteint que 1 % contre 2 % à 3 % dans le Koumys. La peptonisation de l'albumine est aussi moins appréciable. (Bb.36).

De l'ensemble des travaux que nous venons de citer il ressort que les auteurs ne sont pas très d'accord non seulement sur la nature des grains de Képhir mais aussi sur les relations qui peuvent exister entre les fermentations et la semence qui sert à les produire.

ORIGINE DES GRAINS DE KÉPHIR,

VÉRIFICATION DE LEUR ACTIVITÉ

Notre premier soin a été de nous procurer des grains de Képhir frais, provenant directement du Caucase. Grâce à l'amabilité de M. J. Bakhamian, ingénieur à Tiflis, la Société Pharmaceutique du Caucase nous a expédié dans le plus court délai possible des grains purs de Képhir.

Aussitôt en possession de ces grains, nous avons vérifié leur activité et analysé le produit obtenu, pour nous rendre compte si ce lait fermenté se rapprochait du Képhir examiné par les auteurs qui l'ont étudié avant nous.

Après avoir stérilisé du lait à une température de 44⁵°, à l'autoclave, nous l'avons laissé à l'étuve pendant 60 heures à 22°, après ensemencement avec les grains de Képhir.

L'analyse a donné les résultats suivants, que nous avons comparés avec un lait témoin stérilisé :

	PAR LITRE	
	Képhir	Lait stérilisé (témoin)
Matières grasses.....	40,90	41,15
Sucres.....	25,36	45,42
Cendres.....	6,50	6,50
Acide lactique (acidité fixe).....	8,00	0,80
Acide acétique (» volatile) ...	0,60	0,00
Caséine.....	29,10	30,05
Albumoses... ..	2,30	2,10
Peptones (par différence).....	0,75	0,00
Alcool.....	8,00	0,00

Ces dosages ont été faits par les méthodes suivantes :

Cendres (*dosage*). — On incinère le résidu de l'évaporation de 10 cc. de lait ou de képhir jusqu'à ce que les cendres soient blanches, on laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse.

EXEMPLE. — Opéré sur 10 cc. de képhir :

Par double pesée	{	Pesée de la capsule vide	2,500
tare à gauche	{	» » avec cendres..	2,435
		Différence.....	<u>0,065</u>

Par litre de képhir : $0,065 \times 100 = 6$ gr. 50 de cendres.

Lactose (*dosage*). — 1° 10 cc. de lait ou de képhir sont versés dans un vase à précipité avec 25 cc. d'alcool à 65°, acidifiés au 1/1000° par de l'acide acétique en ayant soin de verser goutte à goutte et d'agiter ;

2° Après un quart d'heure de repos on filtre le coagulum sur un filtre préalablement taré et lavé avec de l'alcool, et on recueille le liquide filtré dans un ballon jaugé de 100 cc. ;

3° On lave le filtre avec de l'alcool à 35° et recueille le tout dans le ballon et porte à 100 cc. ;

4° Le lactose est dosé volumétriquement avec une liqueur de Fehling titrée avec une solution à 1 % de Lactose pur.

Beurre et Caséine (*dosage*). — 1° Essorer le filtre de l'opération précédente entre les doubles de papier buvard et l'introduire dans l'appareil à épuisement de Soxhlet ;

2° Verser sur le filtre 10 cc. d'alcool à 95° en laissant le précipité s'humecter un instant ;

3° Mettre dans le petit ballon taré de l'appareil 40 cc. d'éther et faire l'épuisement en chauffant le ballon à 40° au bain-marie ;

4° L'épuisement terminé, détacher le ballon, évaporer l'éther. La différence du ballon avec son poids primitif donnera la quantité de beurre contenu dans 10 cc. ;

5° Le filtre est séché à 100° et pesé en retranchant du poids obtenu le poids du filtre et des cendres on aura le poids de la caséine contenue dans 10 cc. (Bb. 59).

EXEMPLES :

Lactose dans le képhir. — Prise d'essai : 10 cc. de képhir, coagulation, les liquides de lavage du coagulum sont portés à 100 cc. (filtrat A).

Titrage de la Liqueur de Fehling	{	Pris 5 cc. de Liqueur de Fehling.
		Versé 5 cc. 2 de Liqueur de Lactose pur à 1/100,
		5 cc. de Liqueur de Fehling = 0,052 de Lactose.
		(5,20 $\times$ 0,01 = 0,052)

$$\begin{array}{l} \text{Titration} \\ \text{dans le képhir} \\ \text{(dilué à 1/10 (A))} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{Pris 5 cc. de Liqueur de Fehling.} \\ \text{Versé 20 cc. 5 de A,} \quad 0,0520 \times 100 \\ \text{100 cc. de A ou 10 cc. de képhir} = \frac{20,50}{20,50} = 0,2536 \\ \text{Pour un litre de képhir on aura } 0,2536 \times 100 = 25,36 \\ \text{de lactose.} \end{array} \right.$$

Beurre dans le képhir. — Prise : 10 cc. de képhir, le résidu de la coagulation de ces 10 cc. recueilli sur un filtre est dégraissé au Soxhlet par l'éther après avoir mouillé le résidu de 10 cc. d'alcool à 95°.

Pesée du ballon après évaporation des solvants :

$$\begin{array}{l} \text{Par double pesée} \left\{ \begin{array}{ll} \text{Pesée avec le ballon vide.....} & 20,935 \\ \text{» » et beurre} & 20,526 \\ \text{Différence.....} & \underline{\underline{0,409}} \end{array} \right. \end{array}$$

Poids de matière grasse par litre de lait : $0,409 \times 100 = 40,90$.

Caséine dans le képhir. — Le filtre de l'opération précédente, soit la caséine de 10 cc. de képhir est séché à l'étuve et pesé.

$$\begin{array}{l} \text{Méthode} \\ \text{par double pesée} \\ \text{tare à gauche} \end{array} \left\{ \begin{array}{ll} \text{Pesée du filtre séché à 100° avant} \\ \text{la filtration du képhir coagulé..} & 11,195 \\ \text{Pesée du filtre séché à 100° avec} \\ \text{son résidu.....} & 10,893 \\ \text{(a) Différence.....} & \underline{\underline{0,302}} \end{array} \right.$$

Poids des cendres du filtre et du résidu qu'il porte :

$$\begin{array}{l} \text{Par double pesée} \left\{ \begin{array}{ll} \text{Pesée de la capsule de platine vide} & 2,003 \\ \text{tare à gauche} \left\{ \begin{array}{ll} \text{» » avec les cendres.} & 1,992 \\ \text{(b) Différence.} & \underline{\underline{0,011}} \end{array} \right. \end{array} \right. \end{array}$$

Poids de la caséine trouvée : $a - b = 0,302 - 0,011 = 0,291$
pour 10 cc.

Poids de la caséine par litre de képhir : $0,291 \times 100 = 29 \text{ gr. } 10$.

Albumoses (dosage). — Les albumoses ont été dosés par le procédé indiqué par M. le Professeur Grimbert, par précipitation par le sulfate d'ammoniaque, comme il est dit dans le dosage des albumoses dans l'action de la muqueuse d'estomac de porc sur le lait. (Bb. 33).

Peptones (dosage). — Le poids des peptones a été calculé par différence entre la somme des albuminoïdes et des

albumoses dans le lait et la somme des mêmes éléments dans le képhir.

Lait..	{	Caséine.....	30,05	
		Albumoses.....	2,40	
		Total.....		32,45
Képhir....	{	Caséine.....	29,40	
		Albumoses.....	2,30	
		Total.....		31,40
		Différence ..		
				0,75

Soit : 0 gr. 75 peptones par litre de képhir.

Acidité volatile (Méthode de Duclaux). (Bb. 22).

Principe de la méthode. — Supposons une solution à 1 ou 2 % au maximum d'un acide volatil quelconque ; amenons-la à un volume constant, par exemple de 110 cc. et distillons-la dans un ballon de 250 à 300 cc., en relation avec un réfrigérant ordinaire. Recueillons, dans cette distillation, 10 prises successives, chacune de 10 cc. exactement mesurés. Chacune de ces prises est saturée à part, à l'aide d'une solution alcaline quelconque, et on inscrit à la suite des unes des autres les lectures faites successivement sur la burette, à la suite des opérations partielles. Supposons que la quantité totale d'acide introduite dans le ballon exige 100 cc. de la solution alcaline employée. Les lectures successives représenteront alors, en centièmes, les proportions de cet acide existant dans les 10, 20, 30 et 40, etc., premiers centimètres cubes passés à la distillation.

Cela posé, on peut considérer comme démontrées les trois lois suivantes :

1° La marche des nombres dans cette série d'opérations est caractéristique de l'acide volatil employé ;

2° Il existe un rapport constant entre la quantité d'acide introduite dans le ballon et la quantité qui a distillé à un moment quelconque, de sorte que de la quantité passée dans les 10, 20, 30, 40, etc., premiers centimètres cubes, on peut conclure à la quantité d'acide total introduit dans le ballon de distillation ;

3° S'il y a deux acides mélangés, chacun se comporte comme s'il était seul et suit les lois de sa distillation propre. (Bb. 22).

Dosage dans le cas d'un seul acide. — On mesure exactement 110 cc. On distille assez vite pour que l'opération ne dure

pas plus de 40 ou 45 minutes. Chacune des prises de 10 cc., reçue dans un flacon jaugé à col étroit, est saturée à son tour avec de l'eau de chaux. Quand on se sert de teinture de tournesol, il faut arriver au bleu franc, et le virage est facile à saisir, même avec les acides gras comme l'acide butyrique et l'acide valérianique, pour lesquels le bleu définitif est précédé pendant longtemps d'une teinte violette, tenant à ce que les sels de chaux de ces acides sont un peu alcalins. Si on cherche le rapport des volumes d'eau de chaux nécessaires pour saturer les 10, 20, 30, etc., premiers centimètres cubes au volume nécessaire pour saturer l'acide total du ballon, on trouve les rapports suivants pour les acides volatils les plus habituellement rencontrés dans les fermentations.

Lorsque l'acidité, un peu élevée, est supérieure 0,3 ‰, on peut remplacer l'eau de chaux par la soude N/10 ; c'est cette dernière solution qui a été utilisée dans nos dosages.

PREMIER TABLEAU (selon Duclaux, T. III, p. 386) :

	Acide formique	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Acide valérianique
10 cc.	3,5	5,9	11,5	17,3	30,5
20 »	7,2	12,2	22,8	32,7	53,0
30 »	11,3	18,7	33,5	47,0	69,5
40 »	15,5	25,6	44,0	58,5	81,0
50 »	20,2	32,7	54,0	68,8	88,5
60 »	25,5	40,4	63,3	77,5	93,5
70 »	31,1	48,7	72,5	84,3	96,5
80 »	38,5	57,5	81,0	90,5	98,3
90 »	48,0	67,5	88,5	94,6	99,5
100 »	59,0	80,0	95,0	97,5	100,0

Il résulte de cela que la marche des chiffres d'une prise à l'autre suffit souvent pour indiquer l'acide auquel on a affaire, et une fois qu'on est assuré de sa nature, on peut, en s'arrêtant à une prise quelconque, et en cherchant dans le tableau ci-dessus le facteur correspondant, savoir la quantité d'acide volatil existant dans le liquide du ballon.

Par exemple, si on a fait dix prises, et que la marche des nombres coïncide avec celle de l'acide acétique, il suffira, le facteur correspondant à 100 cc. recueillis étant 80,0, de multiplier par 100/80 ou plus simplement par 5/4, le poids d'acide

trouvé dans les dix prises pour avoir le poids de l'acide de la liqueur distillée.

Le nom de l'acide est donc fourni par la marche des nombres fournis par les diverses prises successives. Au lieu d'évaluer ces nombres en centièmes de l'acide du ballon, sur lequel on ne sait rien d'avance, il est plus commode de les évaluer en centièmes de l'acide passé dans les 100 cc. du liquide recueilli. Cela revient à prendre le rapport des nombres contenus dans les colonnes du tableau ci-dessus au nombre du bas de la colonne et on a alors un autre tableau, qui est le suivant :

DEUXIÈME TABLEAU (selon Duclaux, T. III, page 388) :

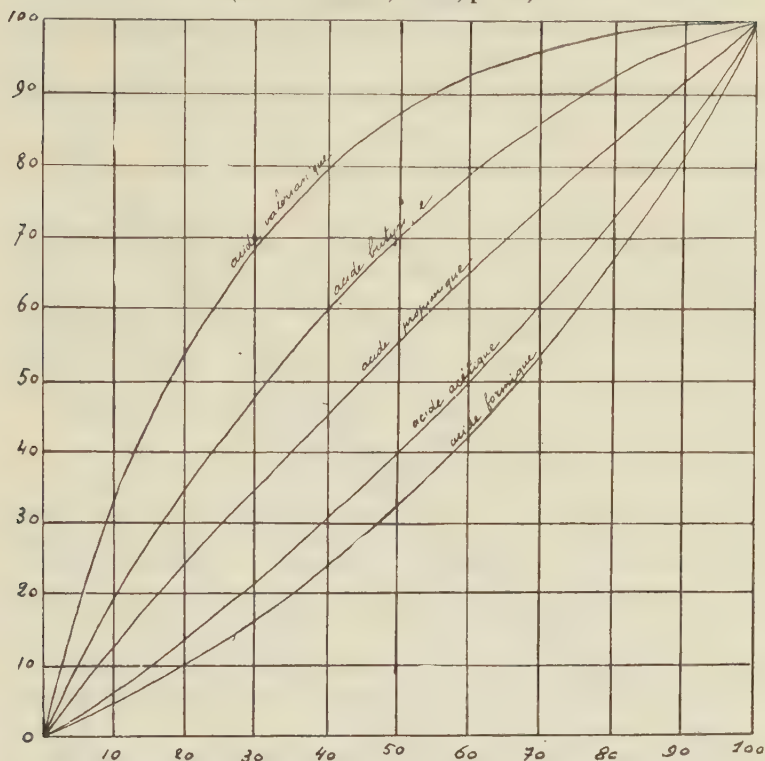
	Acide formique	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Acide valérianique
10 cc.	5,9	7,4	12,1	17,6	30,5
20 »	12,2	15,2	24,0	33,6	53,0
30 »	19,0	23,4	35,3	47,5	69,5
40 »	26,4	32,0	46,2	60,0	81,0
50 »	34,4	40,9	56,8	70,6	88,5
60 »	43,2	50,5	66,7	79,5	93,5
70 »	52,8	60,6	76,2	86,5	96,5
80 »	64,6	71,9	85,0	92,5	98,3
90 »	79,6	84,4	93,0	97,0	99,5
100 »	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Il est donc facile, en comparant les nombres fournis par l'expérience à ceux des tableaux, de savoir à quel acide on a affaire avec la deuxième table. Et à l'aide de la première table, déduire de la quantité qui a passé à la distillation la quantité totale contenue dans le liquide distillé.

Les courbes ci-jointes, traduisent encore la marche de ces nombres.

COURBES DES ACIDES VOLATILS

(Selon Duclaux, T. III, p. 389)

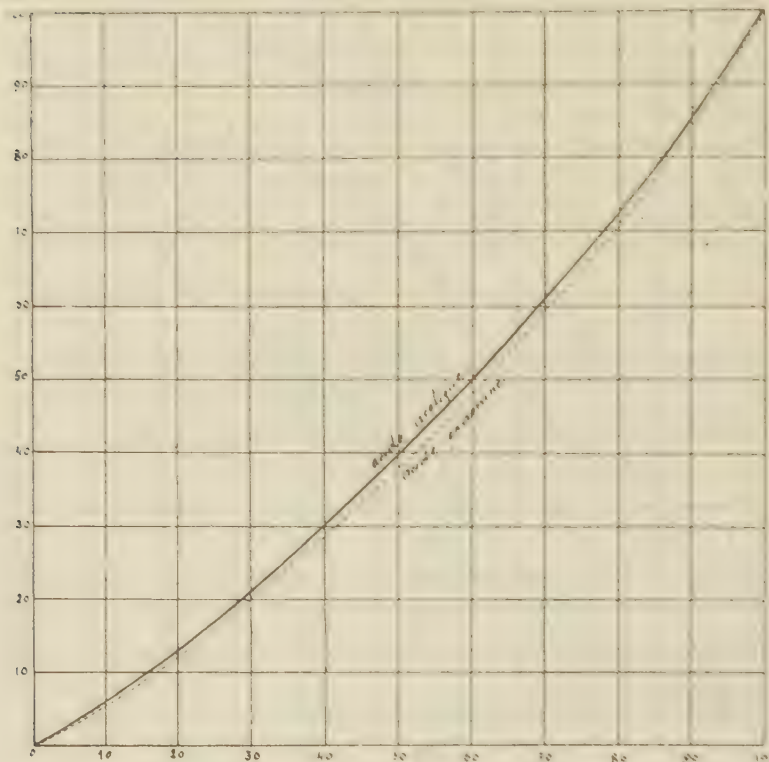


EXEMPLE. — Prise d'essai 100 cc. à laquelle on ajoute 10 cc. (110 cc.) on distille et dose l'acidité par prise de 10 cc., jusqu'à 100 cc.

	Nombre de cc. d'alcali Na OH N/10 utilisés pour neutraliser. (1 ^{er} tableau de Duclaux).	Rapport des chiffres de la colonne précédente au dernier trouvé, évalué en centièmes. (2 ^{me} tableau de Duclaux).
Pour 10 cc. de distillat.	0 cc. 5	6
20 »	1 » 2	15
30 »	1 » 8	22
40 »	2 » 5	30
50 »	3 » 2	40
60 »	4 » 0	50
70 »	4 » 9	60
80 »	5 » 7	70
90 »	6 » 8	84
100 »	8 » 1	100

Les chiffres de la deuxième colonne coïncident le mieux avec ceux de la colonne de l'acide acétique de la deuxième table de Duclaux, l'acide de la liqueur examinée, doit être considéré comme étant de l'acide acétique.

COMPARAISON DE LA COURBE TROUVÉE A LA COURBE DE L'ACIDE ACÉTIQUE
(Selon Duclaux)



	Acide du liquide examiné	Acide acétique
Pour 10 cc.....	6	7,4
20 »	15	15,2
30 »	22	23,4
40 »	30	32,0
50 »	40	40,9
60 »	50	50,5
70 »	60	60,6
80 »	70	71,9
90 »	84	84,4
100 »	100	100

Les travaux de Duclaux ont prouvé qu'il existe un rapport constant entre la quantité d'acide passé dans les 100 premiers cc. et la quantité totale introduite dans le ballon.

Dans le cas de l'acide acétique, le rapport étant de 100 80 ou de $\frac{5}{4}$, la quantité contenue dans un litre est donc de :

$$\frac{8,4 \times 40 \times 0,006 \times 5}{4} = 0,60 \text{ acide acétique par litre (pour le képhir).}$$

Pour exprimer l'acidité volatile, en acide lactique, chiffre nécessaire pour le calcul de l'acidité fixe (acide lactique), dosage ci-dessous, il suffit de multiplier le nombre correspon-

dant à l'acide acétique par le Rapport $\frac{90,4}{60}$ des poids moléculaires.

$$\frac{0,60 \times 90,4}{60} = 0,90$$

Acidité totale. — Sur une prise de 25 cc. de képhir on ajoute de la liqueur alcaline de soude N/10 jusqu'à virage de la phénolphthaléine ajoutée comme indicateur ; le nombre N de centimètres cubes versés multiplié par 40 et par 0/00901 donne la teneur d'acide lactique par litre.

EXEMPLE. — Opéré sur 25 cc. de képhir,
versé 24 cc., 7 de Na OH N/10,
1 cc. de soude N/10 = 0,00901.

Acidité totale en acide lactique par litre = $24,7 \times 40 \times 0,00901 = 8,90$.

Acidité fixe. — S'obtient par différence entre l'acidité totale et l'acidité volatile (exprimée en acide lactique) et se traduit en acide lactique.

Acidité fixe = Acidité totale — Acidité volatile (dosages précédents $8,90 - 0,90 = 8,00$ par litre de képhir.

Alcool (Recherche). — Pour la recherche de très faibles quantités d'alcool, nous avons eu recours au procédé Pasteur modifié par Klöcher. La méthode de Pasteur consiste à porter à l'ébullition le liquide à éprouver dans une cornue à col assez long et à observer l'aspect des premières gouttelettes qui se condensent sur les parois froides au moment où l'ébullition vient de commencer ; s'il y a de l'alcool en petite quantité dans le liquide, ces gouttelettes se montrent sous la forme de larmes ayant une queue allongée ou sous la forme de gouttes petites ou plus grosses, très rondes, larmes et gouttes d'un aspect huileux (Bb. 63).

Klöcher perfectionne cette méthode par un procédé qui demande seulement une petite quantité de liquide et évite la distillation répétée que nécessite quelquefois le procédé Pasteur. La sensibilité de la réaction est également augmentée de telle sorte que 0,002 % d'alcool en volume et même parfois 0,001 % en volume peuvent être décelés.

5 cc. de liquide à éprouver sont mis dans un vase à réaction de 180 mm. de longueur et de 24 mm. de diamètre. On ferme avec un bouchon de liège portant un tube de verre de

80 cm. de long et de 3 mm. de diamètre. L'extrémité inférieure de ce tube traverse le bouchon ; on pose le vase verticalement sur une toile métallique et on chauffe très lentement pour éviter les soubressauts. S'il y a de l'alcool, on verra rapidement des gouttes huileuses caractéristiques dans le tube de verre, plus ou moins haut dans le tube selon la proportion d'alcool, moins il y a d'alcool plus les gouttes siègent haut.

Il est très important de toujours examiner le liquide nutritif en vue de savoir s'il renferme de l'alcool avant de l'ensemencer. (Bb. 48).

A. Béchamp ayant signalé de l'alcool même dans le lait fraîchement trait, nous avons vérifié cette assertion, il nous a été impossible d'en trouver même avec le procédé Klöcher. (Bb. 4).

Pour éviter les causes d'erreur nous avons contrôlé les résultats par la méthode de Lieben.

La méthode de Lieben consiste à produire des cristaux d'iodoforme en mettant l'alcool en contact avec de l'iode et un alcali. L'iodoforme se précipite dans le fond du tube si on a un dépôt très faible, centrifuger et examiner au microscope, où il se présente en tables hexagonales très régulières, quelquefois étoilées. (10 cc. de liquide, 2 gr. de carbonate de soude pur, 0,40 gr. d'iode en poudre, chauffez au bain-marie). (Bb. 51-60).

Avant de distiller le liquide, Maumené conseille de le saturer pour éviter le passage dans le récipient d'une petite portion des acides volatils ou d'un peu d'aldéhyde.

La distillation est poussée jusqu'aux 6/10 du liquide et le produit obtenu, soumis à une nouvelle distillation, si la teneur en alcool est très faible, on peut répéter 3 ou 4 fois cette opération.

Dosage. — Le dosage de l'alcool dans le liquide distillé a été fait par mesure de densité (alcoomètre centésimal de Gay-Lussac en opérant à 15°) pour les liquides riches en alcool (action sur les sucres).

Pour les liquides peu riches en alcool, tel que le képhir, le dosage a été fait avec le compte-gouttes de Duclaux dont le principe est basé sur la différence de vitesse d'écoulement des liquides due à leur tension superficielle dans un tube capillaire. Les mélanges d'alcool et d'eau ont des tensions superficielles plus faibles que l'eau pure. Si on les fait couler par gouttes, sous un volume donné, à travers un orifice de dimensions constantes, le nombre des gouttes qui correspond à chacun de ces mélanges, est constant et d'autant plus grand que la proportion d'alcool est plus grande, de sorte que l'on a là un procédé à la fois alcooscopique et alcoométrique.



L'instrument utilisé est un compte-gouttes-pipette très simple, du volume de 5 centimètres cubes, terminé à sa partie inférieure par un ajutage cylindrique formé d'un tube capillaire assez long pour que l'écoulement se fasse par gouttes se succédant au taux de une par seconde environ. La section de l'orifice sur lequel elles se forment est telle que la pipette remplie d'eau distillée, se vide en donnant 100 gouttes à 15°.

Quand on veut étudier un liquide alcoolique, on en remplit la pipette jusqu'au trait d'affleurement supérieur, on nettoie avec du papier buvard l'orifice d'écoulement qui doit être maintenu bien propre, et surtout ne jamais être gras; on dresse la pipette sur un flacon et on laisse couler en comptant les gouttes. Le tableau ci-joint donne les titres alcooliques correspondant aux divers nombres de gouttes à diverses températures.

Températures	10°	15°	20°
Eau distillée	99	100	101
Alcool à 0,5 %	103	104	105
1 %	106	107	108
2 %	112	113	114,5
3 %	117	118	119,5
4 %	121,5	122,5	124,5
5 %	125	126,5	128,5
6 %	128,5	130,5	132,5
7 %	132	134	136,5
8 %	135,5	137,5	140
9 %	138,5	140,5	143
10 %	141,5	144	146,5

(Extrait du tableau selon Duclaux, T. III, p. 8).

Ce procédé est suffisamment précis, pour les liquides très faiblement alcoolisés, puisque entre l'eau pure et l'eau à 1 % d'alcool, il y a une différence de 7 gouttes à 15°. (Bb. 22).

EXEMPLE. — *Dosage de l'alcool dans le képhir* : 200 cc. de képhir, neutralisé pour éviter le passage des acides volatils, placés dans un grand ballon de 2 litres pour ne pas être gêné par la mousse sont distillés jusqu'à passage complet de l'alcool. Le distillat est ramené au volume de 200 cc. et à la température de 15°.

Le compte-gouttes de Duclaux a donné avec ce liquide :

1 ^{er} Essai.....	106 gouttes
2 ^{me} »	108 »
3 ^{ine} »	107 »
4 ^{me} »	107 »
Total.....	<u>428</u>

Moyenne 107.

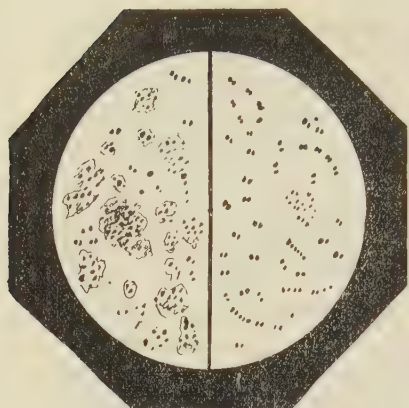
D'après la table de Duclaux 107 gouttes correspondent à 1°.

Le liquide distillé contient donc 1 % d'alcool en volume.

en poids $1 \times 0,8 = 0,80 \%$

soit $0,80 \times 10 = 8$ gr. par litre de képhir.

micrococus



Vieux

jeune

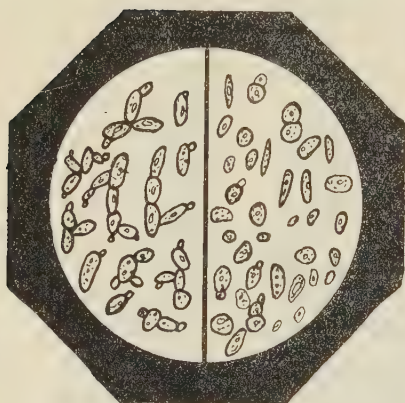
Bacille



Vieux

jeune

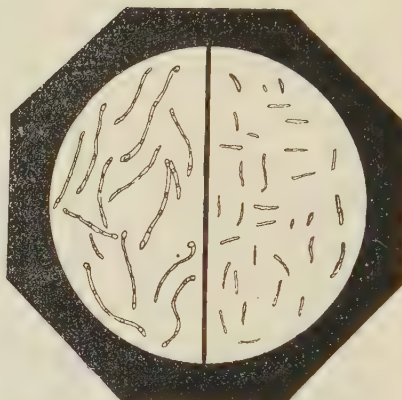
Leurre



vieille

jeune

Bacille fortement grossi



Vieux

jeune

Corula



vieille

jeune

ISOLEMENT DES GERMES

Si on broie dans l'eau, avec du sable et du verre pilé, les grains dont nous venons d'essayer l'activité, on remarque des formes levures, des formes bacilles très longs, des formes coccus.

Examinons maintenant quels sont les germes principaux contenus dans nos grains.

L'isolement des formes levures a été obtenu de la façon suivante : sur plaque à la gélose nutritive. Cette gélose était préparée d'après la formule ci-dessous :

Eau de levure.....	100 gr.
Gélose.....	2 »
Glucose	10 »
Lactose.....	5 »

le tout stérilisé à l'autoclave à 115°.

Les grains de képhir sont mis à gonfler dans le lait pendant 48 heures, on agite fréquemment avec force. Lorsque la fermentation est bien partie, on prend après vive agitation avec un fil de platine une gouttelette de lait et on fait des frottis sur cinq boîtes de Petri, sur lesquelles on a étalé et refroidi le milieu gélose et eau de levure.

Au bout de 5 à 6 jours de culture à la température de 20 à 25° on obtient des colonies blanches et jaunâtres très bien isolées sur les deux ou trois dernières plaques. Seules les formes levures du képhir se sont développées sur ce milieu sucré exposé au large contact de l'air.

Les essais d'isolement en milieu gélosé sur plaque de Petri nous ayant montré que les coccus et les bacilles du képhir ne se développaient pas au large contact de l'air, nous avons essayé la méthode de Liborius-Veillon, en tube gélosé glucosé et la méthode des dilutions dans le lait mis en couche très haute, le beurre formant bouchon protecteur contre l'oxygène de l'air. Avec ces deux procédés aussi recommandables l'un que l'autre, nous avons pu isoler très facilement le bacille et le micrococcus aperçus dans le grain de képhir broyé.

Les méthodes ci-dessus nous ont permis d'isoler une levure, une torula, un bacille et un micrococcus, dont nous allons maintenant donner la morphologie. (Bb. 33).

MORPHOLOGIE DES GERMES ÉTUDIÉS

LEVURE

I. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

- 1° Cellules ovoïdes de 4 à 6 μ pour le grand diamètre, de 3 à 4 μ pour le petit ;
- 2° Ne donne jamais de pellicule ou de voile sur les milieux liquides ;
- 3° Donne des enduits visqueux blanchâtres sur les milieux solides ;
- 4° Se colore par les couleurs d'aniline ;
- 5° Reste colorée par la méthode de Gram, la membrane exceptée.
- 6° Nous n'avons pas pu obtenir la formation de spores, ni sur blocs de plâtre (Pr. Holm et Poulsen) ni par cultures à diverses températures, ni par addition d'antiseptiques. Le milieu préconisé par A. A. Gioradkawa (gélose, bouillon de viande glycosé salé) ne nous a pas donné de meilleurs résultats. (Bb. 44-31).

II. CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

A) CARACTÈRES DE CULTURE ET MODE DE CROISSANCE DANS LES MILIEUX SUIVANTS :

- 1° Bouillon nutritif. — Se développe bien à 22-25° en trois ou quatre jours, dépôt régulier, compact, non floconneux au fond du tube ;
Bouillon peptoné lactosé. — Dépôt très abondant au fond du tube en trois ou quatre jours à 22-25° ;
- 2° Plaques de gélatine. — Colonies opaques, rondes, blanches en surface et en profondeur, peu dures, visqueuses, peu nombreuses ;
Plaques de gélatine lactosée. — Culture semblable très abondante ;
- 3° Tubes de gélatine. — Culture sur la surface libre à l'air, pas de liquéfaction ;
Tubes de gélatine lactosée. — Culture semblable plus abondante ;
- 4° Plaques d'agar. — Culture peu abondante, colonies opaques rondes, blanches, légèrement visqueuses ;
Plaques d'agar lactosé. — Culture semblable très abondante ;

- 5° Tubes d'agar. — Culture visqueuse sur la surface libre pas très abondante ;
Tubes d'agar lactosé. — Culture très abondante à la surface libre du tube ;
6° Pomme de terre. — Léger enduit visqueux blanchâtre ;
Carottes. — Léger enduit visqueux blanchâtre ;
7° Lait. — Dépôt très abondant au fond du tube, pas de coagulation ni de fermentation ;
8° Sérum sanguin. — Culture peu abondante, léger enduit visqueux.

I. *Milieux généraux :*

- Liquide de Raulin acide normal. — Culture peu abondante au fond du ballon, fermentation à peine visible.
Liquide de Raulin neutre. — Culture à peine visible, très peu abondante au bout de vingt jours.
Liquide de Raulin acide normal gélatiné à 1/20 :
Culture à 26° : milieu liquide, fermentation très faible, dégagement gazeux à peine visible ;
Culture à 48° : milieu solide, culture en surface, traces d'alcool.
Liquide de Raulin neutre gélatiné à 1/20 :
Culture à 26° : milieu liquide, fermentation très faible, dégagement gazeux à peine visible ;
Culture à 48° : milieu solide, culture en surface, traces d'alcool.

II. *Milieu azoté avec azote organique :*

- Liquide de Raulin neutre sans azotate d'ammoniaque + urée. — Culture peu abondante, très léger dépôt, fermentation à peine visible.

III. *Milieux renfermant diverses matières sucrées ou alcools polyatomiques :*

- Liquide de Raulin + glucose. — Culture peu abondante en dépôt, fermentation plus nette.
Liquide de Raulin + lévulose. — Culture peu abondante, fermentation peu active.
Liquide de Raulin + galactose. — Culture peu abondante, fermentation peu active.
Liquide de Raulin + maltose. — Culture peu abondante, pas de dégagement gazeux visible, traces d'alcool.
Liquide de Raulin + lactose. — Culture peu abondante, fermentation néant.
Liquide de Raulin + glycérine. — Culture très faible.
Liquide de Raulin + amidon. — Culture très faible, pas de sécrétion d'amylase.
Liquide de Raulin + inuline. — Culture très faible.

B) FAITS BIOCHIMIQUES :

- 1° Température optima 23°, température mortelle 49° en cinq minutes, ne fonctionne plus vers 32° ;
- 2° Anaérobic facultatif ;
- 3° Vit de préférence en milieu acide mais peut vivre en milieu alcalin ;
- 4° Réduit très légèrement les nitrates sans dégagement gazeux ;
- 5° Ne produit pas d'indol ;
- 6° Produit de faibles quantités d'acides fixes et volatils (succinique et acétique) ;
- 7° Ne forme pas de pigments ;
- 8° Développe dans le lait une légère odeur de fermentation et l'odeur spéciale du képhir.

C) PATHOGÉNIE :

N'est pas pathogène ni en injections intra-veineuses, ni en injections sous-cutanées, ni par ingestion. (L'expérience a porté sur des cobayes auxquels on a injecté des bouillons de culture, à raison de 1 cc. en inj. s. cut. et 1/10 de cc. en inj. int. vein.)

Sur les conseils de M. le Professeur Lütz nous avons demandé une culture de *Saccharomyces Kefir* à M^{lle} la Doctoresse G. Westerdijk d'Amsterdam, directrice du bureau spécial de culture des moisissures, de l'Association Internationale des Botanistes. Nous avons reçu une levure, cultivée depuis trois ou quatre ans sur moût de bière et provenant de la Hefenreinzuht Station de Geisenheim. Mais notre aimable correspondante n'a pu nous dire si c'était bien le vrai *Saccharomyces Kefir* de Freudenreich.

Nous avons répété les mêmes épreuves avec cette levure.

Morphologie de la levure reçue d'Amsterdam.

I. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

- 1° Cellules ovoïdes de 5 à 7 μ pour le grand diamètre, de 4 à 5 μ pour le petit ;
- 2° Ne donne jamais de pellicule ou de voile sur les milieux liquides ;
- 3° Donne des enduits visqueux blanchâtres sur les milieux solides ;
- 4° Se colore par les couleurs d'aniline ;
- 5° Reste colorée par la méthode de Gram, la membrane exceptée.
- 6° Nous n'avons pas pu obtenir de spores, ni sur blocs de plâtre, ni par cultures à diverses températures, ni par addition d'antiseptiques. Le milieu de A. A. Gioradkawa ne nous a pas donné de meilleurs résultats.

II. CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

A) CARACTÈRES DE CULTURE ET MODE DE CROISSANCE DANS LES MILIEUX SUIVANTS :

- 1° Bouillon nutritif. — Se développe bien à 22-25° en trois ou quatre jours, dépôt régulier, compact, non floconneux au fond du tube ;
Bouillon peptoné lactosé. — Dépôt très abondant au fond du tube en trois ou quatre jours à 22-25° ;
- 2° Plaques de gélatine. — Colonies opaques, très épaisses, dures, rondes, blanches en surface et en profondeur, peu nombreuses ;
Plaques de gélatine lactosée. — Culture semblable mais très abondante ;
- 3° Tubes de gélatine. — Culture sur la surface libre à l'air, pas de liquéfaction ;
Tubes de gélatine lactosée. — Culture semblable plus abondante ;
- 4° Plaques d'agar. — Culture peu abondante, colonies opaques, rondes, blanches et visqueuses.
Plaques d'agar lactosé. — Même culture très abondante ;
- 5° Tubes d'agar. — Culture sur la surface libre, peu abondante ;
Tubes d'agar lactosé. — Culture très abondante à la surface libre ;
- 6° Pomme de terre. — Léger enduit blanchâtre.
Carottes. — Mêmes résultats ;
- 7° Lait. — Dépôt très abondant au fond du tube, pas de coagulation ni de fermentation ;
- 8° Sérum sanguin. — Culture peu abondante.

I. Milieux généraux :

- Liquide de Raulin acide normal. — Culture peu abondante au fond du ballon, fermentation à peine visible.
- Liquide de Raulin neutre. — Culture à peine visible, très peu abondante au bout de 20 jours.
- Liquide de Raulin acide normal gélatiné à 1/20 :
Culture à 26° : milieu liquide, fermentation très faible, dégagement gazeux à peine visible ;
Culture à 18° : milieu solide, culture en surface, traces d'alcool.
- Liquide de Raulin neutre gélatiné à 1/20 :
Culture à 26° : milieu liquide, fermentation très faible, dégagement gazeux à peine visible ;
Culture à 18° : milieu solide, culture en surface, traces d'alcool.

II. *Milieu azoté avec azote organique :*

Liquide de Raulin neutre sans azotate d'ammoniaque + urée. — Culture peu abondante, très léger dépôt, fermentation à peine visible.

III. *Milieux renfermant diverses matières sucrées ou alcools polyatomiques :*

Liquide de Raulin + glucose. — Culture peu abondante en dépôt, fermentation plus nette.

Liquide de Raulin + lévulose. — Culture peu abondante, fermentation peu active.

Liquide de Raulin + galactose. — Culture peu abondante, fermentation peu active.

Liquide de Raulin + maltose. — Culture peu abondante, pas de dégagement gazeux visible, traces d'alcool.

Liquide de Raulin + lactose. — Culture peu abondante, fermentation néant.

Liquide de Raulin + glycérine. — Culture très faible.

Liquide de Raulin + amidon. — Culture très faible, pas de sécrétion d'amylase.

Liquide de Raulin + inuline. — Culture très faible.

B) CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

1° Température optima 23°, température mortelle 49° en cinq minutes, ne fonctionne plus vers 32° ;

2° Anaérobie facultatif ;

3° Vit de préférence en milieu acide, peut vivre en milieu alcalin ;

4° Réduit très légèrement les nitrates sans dégagement gazeux ;

5° Ne produit pas d'indol ;

6° Produit de faibles quantités d'acides fixes et volatils (succinique et acétique ;

7° Ne forme pas de pigments ;

8° Développe dans le lait une légère odeur de fermentation et l'odeur spéciale du képhir.

C) PATHOGÉNIE :

N'est pathogène ni en injection sous-cutanée, ni en injection intra-veineuse, ni par ingestion.

Dans cette deuxième série d'expériences on constate que l'épaisseur des cultures est sensiblement plus grande que dans la première série ; mais l'ensemble des épreuves permet de croire que ces deux levures sont les mêmes et que la différence signalée plus haut résulte du long passage de cette dernière sur moût de bière.

TORULA

I. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

- 1° Cellules de forme sphériques de 4 à 5 μ , dans le plus grand diamètre, de 3 à 4 μ dans le petit ; cellules contenant une vacuole assez forte avec un granulin réfringent dans la vacuole. Pousse en voile abondant dans tous les liquides où elle se développe ; pousse en cultures tourmentées mamelonnées sur les milieux solides, en forme de membranes dures et adhérentes ;
- 2° Se colore parfaitement par les couleurs d'aniline. Reste colorée par la méthode de Gram ;
- 3° Ne forme pas de spores sur aucun des milieux usuels employés pour cette production. Se reproduit par bourgeonnement.

II. CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

A) CARACTÈRES DE CULTURE ET MODE DE CROISSANCE DANS LES MILIEUX SUIVANTS :

- 1° Bouillon nutritif. — Culture au fond du tube en quatre ou cinq jours et voile abondant mamelonné à 18 ou 20° ;
Bouillon peptoné lactosé. — Culture très abondante au fond du tube et voile très abondant, très plissé en quatre ou cinq jours ;
- 2° Plaques de gélatine au bouillon. — Culture en surface plissée, dure, adhérente, mamelonnée, irrégulière, jaunâtre, souvent en choux-fleurs ;
- 3° Tubes de gélatine. — Culture en surface mamelonnée, irrégulière, plissée. Pas de liquéfaction, ni de cupule, ni d'entonnoir ;
- 4° Plaques d'agar. — Colonies jaunâtres, mamelonnées, plissées ;
- 5° Tubes d'agar. — Culture en surface mamelonnée, irrégulière, plissée, dure, adhérente ;
- 6° Pomme de terre. — Faibles colonies mamelonnées, jaunâtres ;
Carottes. — Faibles colonies mamelonnées, jaunâtres ;
- 7° Lait. — Culture au fond du tube, voile très faible ;
- 8° Sérum. -- Culture en faibles colonies mamelonnées, jaunâtres.
Ensemencement en liquide de Raulin sans sucre. — Culture, néant.
Ensemencement en liquide de Raulin acide. — Voile, culture peu abondante.
Ensemencement en liquide de Raulin neutre sucré. — Culture peu abondante.
Ensemencement en liquide de Raulin gélatiné sucré. -- Culture peu abondante ;

Ensemencement sur albumine de l'œuf de poule. — Cultures mamelonnées, jaunâtres, pas de liquéfaction (pas de digestion).

B) CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

- 1° Température optima, 18-23°, température mortelle 55° en cinq minutes ;
- 2° Vie plutôt aérobie ;
- 3° Vit en milieu acide et en milieu alcalin ;
- 4° Réduit très faiblement les nitrates sans dégagement gazeux ;
- 5° Ne produit pas d'indol ;
- 6° Produit de faibles quantités d'acides fixes et volatils en présence des sucres ;
- 7° Coloration jaunâtre de toutes les cultures ;
- 8° Ne développe pas d'odeur.

C) PATHOGÉNIE

N'est pas pathogène ni en injection intra-veineuse, ni en injection sous-cutanée, ni par ingestion.

BACILLE

1. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

- 1° Bacille très court dans les cultures jeunes : 1 à 3 μ , très allongé dans les cultures âgées : 5 à 11 μ ;
- 2° Les formes très allongées, formant chaînes par association, sont peu nombreuses ; la forme dominante est la forme à un seul article allongé, légèrement renflé. Quelques formes en S et en fouet par association ;
- 3° Se met en amas et parfois en chaînes dans lesquelles on distingue mal la séparation des articles ;
- 4° Se colore facilement par les couleurs d'aniline. Reste coloré par la méthode de Gram ;
- 5° Ne présente pas de capsules ;
- 6° Pas de cils ou de flagella, immobilité ou mobilité très douteuse ;
- 7° Présente souvent à ses deux extrémités deux renflements que l'on pourrait prendre pour des spores ; mais ces corpuscules se colorent exactement comme le reste du bacille. Les cultures un peu âgées qui en renferment davantage se conduisent vis-à-vis de la chaleur et des antiseptiques comme les cultures jeunes peu riches en corpuscules. Il est alors difficile de leur attribuer le rôle de spores ;
- 8° Dans les cultures très jeunes, les microbes ont des dimensions très courtes, mais par vieillissement, ils arrivent à atteindre 8 à 15 μ . Ces formes longues sont le plus souvent formées d'un seul article sans association.

II. CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

A) CARACTÈRES DE CULTURE ET MODE DE CROISSANCE DANS LES MILIEUX SUIVANTS :

- 1° Bouillon nutritif. — Pousse très lentement, léger dépôt dans le fond des tubes, liquide surnageant clair ; après deux ou trois passages meurt ; température la plus favorable 22 à 25° ; pas de voile ;
Bouillon peptoné saccharosé 15 %. — Culture un peu plus abondante, cultive au bout de quatre à cinq jours à 22-25° ; flocons au bas du tube ;
- 2° Plaque de gélatine au bouillon. — Culture néant ;
Plaque de gélatine au bouillon lactosé. — Culture néant ;
Plaque de gélatine au bouillon lactosé peptoné. — Culture néant ;
Plaque de gélatine au lait écrémé. — Culture néant ;
- 3° Tube de gélatine. — Ensemencé par piqûre allant au fond, le microbe se développe peu vers la partie profonde de la trainée. Tend à s'étaler légèrement entre le fond du tube et la gélatine. Au bout de 15 jours la gélatine est un peu ramollie. Pas de cupule ni d'entonnoir ;
Culture en gélatine lactosée, en tube de Liborius-Veillon, colonies grises, blanchâtres, opaques, peu nombreuses. Température 20-25° ;
- 4° Tube d'agar. — Culture lente, 12 à 15 jours à 22-25°. Par piqûre en profondeur se développe au fond dans la partie profonde entre le tube de verre et le milieu de culture. Culture sur agar lactosé en tube de Liborius-Veillon, colonies grises, blanchâtres, plus nombreuses que sur gélatine ;
- 5° Pommes de terre. — Milieu aérobie, culture néant ;
Milieu anaérobie, légère culture à 22° à peine visible, meurt après deux passages ;
- 6° Lait. — Développement actif à 22-25°, coagulation en 8-15 jours ;
- 7° Sérum sanguin. — Néant.

B) FAITS BIOCHIMIQUES :

- 1° Température optima 20-25°, température mortelle 55° en 8 minutes ;
- 2° Aérobie facultatif, mais plutôt anaérobie ;
- 3° Réduit très faiblement les nitrates sans dégagement gazeux ;
- 4° Ne produit pas d'indol ;
- 5° Ne produit pas de pigments ;
- 6° Ne développe pas d'odeur.

C) PATHOGÉNIE :

N'est pas pathogène ni par ingestion, ni par inoculation sous-cutanée, ni par inoculation intra-veineuse.

Milieu le plus favorable à sa conservation :

Lait avec craie,
ou Bouillon sucré (lactose 5, saccharose 5) avec craie.

MICROCOCCLUS

I. CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES.

- 1° Coccobacille de forme ovale, de 1 à 2 μ , très souvent par groupe de deux en diplocoque. Dans les cultures jeunes en bouillon sucré souvent en chapelet. Dans les formes très vieilles en amas formant grumeaux et zooglyphes ; rappelle les formes de la graisse du vin et de la bière et celles du *Leuconostoc mesenteroides* ;
- 2° Se colore facilement par les couleurs d'aniline. Reste coloré par la méthode de Gram ;
- 3° Coccus immobile, ne présente pas de cils ou de flagella ;
- 4° Ne donne pas de spores ;
- 5° Aurait tendance à prendre des formes plus allongées en vieillissant, tend vers la forme bacille.

II. CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

A) CARACTÈRES DE CULTURE ET MODE DE CROISSANCE DANS LES MILIEUX SUIVANTS :

- 1° Bouillon nutritif. — Pousse lentement en quatre ou cinq jours, légers flocons en dépôt au fond du flacon. Température la plus favorable 22-25° ; ne cultive bien que si le liquide a une grande hauteur dans le tube de culture. Au bout d'une série de passages en bouillon, la culture finit par ne plus pousser ;
Bouillon peptoné au saccharose 15 %. — Culture abondante en quatre ou cinq jours à la température de 22-25°, gros flocons en dépôt au fond du flacon formant masse visqueuse. Pas de trouble uniforme, pas de voile sur la surface dans aucun bouillon ;
Au premier et au deuxième passages, cultive en bouillon nutritif et en bouillon peptoné au saccharose, dans un tube contenant peu de liquide (vie aérobie possible dans les premiers passages avec des germes très vigoureux) ;
- 2° Plaques de gélatine au bouillon. — Culture néant ;
Plaques de gélatine au bouillon lactosé. — Culture néant ;

Plaques de gélatine au bouillon lactosé peptoné. — Culture néant ;

Plaques de gélatine au lait écrémé. — Culture néant ;

- 3° Tubes de gélatine. — Culture lente en un à douze jours à 22-25°. Ensemencé par piqure allant au fond du tube, le microbe se développe vers la partie profonde de la trainée et tend à s'étaler légèrement à la partie inférieure du tube entre le verre et la gélatine ;

Au bout de 20 jours à 18° la gélatine paraît un peu ramollie, surtout dans la partie profonde, mais elle n'est pas fluidifiée, elle se dissout plus vite que dans le tube témoin lorsqu'on la chauffe. Pas de trace de cupule ou d'entonnoir ;

Culture en gélatine lactosée en tube de Liborius Veillon. — Colonies blanchâtres, opaques, surtout dans les parties profondes ;

- 4° Tubes d'agar. — Culture lente en 18 à 15 jours à 22-25°. Par piqure en profondeur se développe dans la partie profonde de la trainée et s'étale légèrement au fond entre le verre et l'agar ;

Culture sur agar lactosé en tube de Liborius Veillon. — Colonies blanchâtres, rondes, opaques, surtout en profondeur ;

- 5° Pomme de terre. — Milieu aérobie, culture néant ;

Milieu anaérobie, légère culture à 22° à peine visible, léger vernis presque invisible ; meurt après trois ou quatre passages sur ce milieu peu favorable ;

- 6° Lait. — Développement très actif au fond des tubes, à la température de 22-25°, coagulation en 8 à 10 jours ;

- 7° Sérum sanguin. — Néant.

B) FAITS BIOCHIMIQUES.

- 1° Température optima 22-25°, température mortelle 58° en cinq minutes ;

- 2° Anaérobie sur les milieux solides. — Peut être considéré comme faiblement aérobie dans les deux ou trois premiers passages ; cultive dans tout le liquide étalé en lame mince, mais ne donne jamais de voile en surface ;

- 3° Réduit très faiblement les nitrates sans dégagement gazeux ;

- 4° Produit de l'acide lactique et des acides volatils ;

- 5° Ne produit pas de pigments ;

- 6° Ne produit pas d'indol ;

- 7° Ne développe pas d'odeur.

C) PATHOGÉNIE

N'est pas pathogène ni par ingestion, ni par inoculation sous-cutanée, ni par inoculation intra-veineuse. (Bb. 33-56).

Cherchons maintenant à établir quel peut être le rôle de nos divers éléments microbiens retirés du grain de képhir.

ACTION DE LA LEVURE SUR LES SUCRES

(Fermentation alcoolique)

Lactose. — Nous avons pris du lactose rendu aussi pur que possible par plusieurs cristallations successives dans l'eau. Nous avons préparé le milieu suivant :

Eau	100 grammes
Lactose.....	45 »
Peptone.....	4 »
Phosphate d'ammoniaque	0,4 »
Cendres de levure	0,4 »

On stérilise le tout par filtration sur bougie Chamberland pour éviter toute action de la chaleur sur le lactose.

On ensemence avec de la levure pure provenant d'une culture sur gélose nutritive au lactose. Cette culture est entretenue depuis 6 mois par passages successifs sur milieu au lactose pur.

On laisse à l'étuve entre 20° et 25° pendant un mois. Un dispositif est installé pour recueillir les gaz qui auraient pu se produire au cours de l'opération.

On n'observe pendant toute la durée de l'opération aucune fermentation active avec dégagement gazeux : il y aurait plutôt absorption que dégagement.

On voit peu à peu se former au fond du vase un abondant dépôt blanchâtre formé par de la levure.

Après trois semaines nous avons distillé le liquide. Nous n'avons pas trouvé trace d'alcool, ni par la méthode de Pasteur, perfectionnée par A. Klöcker, ni par la méthode de l'iodoforme qui a été douteuse.

Lait. — Comme il s'agissait d'une levure acclimatée au lait, on aurait pu penser que la fermentation ne se produisait pas parce que notre milieu artificiel n'était pas favorable à ce germe habitué à vivre dans le lait. Nous avons pris du lait recueilli aseptiquement et neutralisé, nous l'avons stérilisé par chauffages répétés à 55°.

Les résultats ont été à peu près identiques, nous n'avons trouvé que des traces d'alcool par la méthode de Pasteur et par la réaction de l'iodoforme. On peut attribuer ces traces d'alcool à l'intervention par la chaleur, d'un peu de lactose.

Glucose. — La fermentation ayant été nulle avec le lactose, nous avons opéré avec le glucose pur. Nous avons dans

le milieu nutritif précédent remplacé le lactose par 15/100 de glucose.

Au bout de 24 heures on observe une fermentation très active avec un vif dégagement gazeux. Cette fermentation est très nette pendant 15 jours. Au bout d'un mois, l'analyse du liquide nous a donné les résultats suivants :

		Tube témoin
Alcool % en volume.....	8,8	0
Acidité totale (acide lactique).. par litre.	0,80	0,20
Acidité volatile (acide acétique) »	0,48	traces
Sucre restant..... »	2,10	150
Poids de levure sèche..... »	0,40	0

Les acides volatils identifiés par la méthode de Duclaux ont donné une courbe voisine de celle de l'acide acétique. (Voir page 22).

CHIFFRES TROUVÉS

1 ^{re} table de Duclaux	2 ^{me} table de Duclaux
0,5	8
0,9	14
1,5	23
2,05	32
2,70	42
3,20	50
3,90	60
4,70	73
5,50	85
6,40	100

Nous avons dosé les éthers, aldéhydes et alcools supérieurs, voici les résultats :

		Tube témoin
Ethers exprimés en éther acétique, par litre.	0,193	néant
Aldéhydes	0,010	néant
Alcools supérieurs.....	0,012	néant

Galactose. — Les mêmes essais ont été repris avec le galactose, les résultats ont été les suivants :

		Tube témoin
Alcool % en volume.....	6,1	0
Acidité totale (acide lactique). par litre.	1,05	0,30
Acidité volatile	» 0,22	0
Sucre restant..... »	47,30	150
Poids de levure sèche	» 0,60	0
Ethers (en éther acétique).... »	0,180	néant
Aldéhydes	» 0,012	néant
Alcools supérieurs (alcool amylique)	0,025	néant

Saccharose. — Les mêmes essais ont été repris avec le saccharose, la fermentation active commence au bout de 24 heures, avec fort dégagement gazeux. Après un mois de culture l'examen du liquide a donné les résultats suivants, pour 150 grammes de saccharose par litre :

		Tube témoin
Alcool % en volume	7,8	0
Acidité totale (acide lactique) . par litre.	1,34	0,45
Acidité volatile..... »	0,66	traces
Sucre restant..... »	18,10	150
Poids de levure sèche	0,30	0
Ethers (en acétate d'éthyle)... »	0,250	traces
Aldéhydes	0,015	néant
Alcools supérieurs (alcool amylique)....	0,013	néant

ACTION DE LA LEVURE SUR LES SUCRES (*Résumé*)

	Lactose 45 %	Galactose 45 %	Glucose 45 %	Saccharose 45 %
Alcool % en volume.....	0,	6,1	8,8	7,80
Acidité totale	0,15	1,05	0,80	1,34
(en acide lactique)				
Acidité volatile	traces	0,22	0,48	0,66
(en acide acétique)				
Sucre restant.....	147,10	47,30	2,10	18,10
Poids de levure sèche	0,35	0,60	0,40	0,30
Ethers	traces f.	0,180	0,193	0,25
(exprimés en éther acétique)				
Aldéhydes.....	traces f.	0,012	0,010	0,015
Alcools supérieurs	néant	0,025	0,012	0,013
(alcool amylique)				

Ces résultats ont été obtenus par les méthodes suivantes :

Alcool (*dosage*). — Le dosage de l'alcool a été fait par mesure de densité, en opérant sur le distillat du liquide fermenté, ramené au volume primitif et à la température de 15°. Il a été exprimé en volume %.

Acidité totale (*dosage*). — Ce dosage a été fait comme il a été dit pour le képhir. (Voir page 23).

Levure (dosage). — Le liquide fermenté est jeté sur un filtre taré avec un filtre de même papier ; on a soin de faire tomber peu à peu le dépôt collé au fond du vase. Le précipité recueilli sur le filtre est lavé, séché et pesé.

EXEMPLE. — *Dosage de la levure dans la fermentation de la saccharose* (p. 40) : Opéré sur 100 cc.

Par double pesée	{	Poids du filtre séché à 100° avant l'opé- ration.....	5,50
		Poids du filtre séché à 100° avec son résidu.....	5,47
		Différence.....	<u>0,03</u>

Soit : 0 gr. 03 par 100 cc. et $0,03 \times 10 = 0,30$ de levure sèche par litre de fermentation.

Alcools supérieurs. — *Recherche qualitative* (Méthode de Traube).

PRINCIPE. — *Extraction par le tétrachlorure de carbone et oxydation par le bichromate.*

On concentre autant que possible l'alcool provenant d'une grande quantité du liquide de fermentation, par distillations successives. On prend 100 cc. de cet alcool, on y ajoute une solution saturée de sel marin, de façon à donner au mélange une densité de 1,10 et on agite quatre fois de suite avec 25 cc. de tétrachlorure de carbone pur, ce qui fait en tout 100 cc. Après l'avoir séparé, ce tétrachlorure est lavé une fois avec un peu de solution saturée de sel, deux fois avec une solution saturée de sulfate de soude, et on filtre. On ajoute alors une quantité suffisante de bichromate de potasse et d'acide sulfurique dilué, et on fait bouillir huit heures sous un condenseur à reflux. Puis on distille, on rajoute de l'eau quand la distillation s'achève, et on la pousse en dernier lieu jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 5 cc. de liquide dans la cornue. Le produit distillé, qui mesure environ 200 cc. et qui consiste en une couche d'eau surnageant le tétrachlorure est titré avec une solution alcaline, décime de chaux ou de baryte, en se servant d'abord du méthylorange et ensuite de la phénolphtaléine comme indicateur. Le méthylorange n'est pas affecté par les acides organiques, il est destiné uniquement au dosage de la petite quantité d'acide chlorhydrique qui a pu se former et distiller pendant l'opération. Quand le virage a lieu, on rajoute la phénolphtaléine pour le dosage des acides volatils. Les sels formés se dissolvent dans l'eau qu'on peut séparer, évaporer. La pesée du résidu, dans lequel on connaît la quan-

tité de baryte ou de chaux, permet de se faire une idée de leur poids moléculaire.

On diminue du poids du résidu celui du chlorure qui est donné par le dosage au méthylorange et on a ainsi le poids correspondant au sel organique. Le rapport qui existe entre le poids de ce sel organique et la quantité de baryum contenue dans le résidu, diminuée du baryum du chlorure, donne un renseignement sur le poids moléculaire et par suite sur la nature de l'acide. Lorsqu'on a des liquides de fermentation riches en alcools supérieurs, on peut prendre du liquide distillé après le traitement par le bichromate ; ce liquide contient des acides volatils que l'on peut identifier par la méthode de Duclaux ; connaissant les acides on remonte aux alcools. (Bb.78)

EXEMPLE. — Opéré sur le liquide de fermentation de la saccharose (p. 40) concentré par distillation, à un degré 10 fois supérieur au liquide primitif.

Prise de 100 cc., épuisement au tétrachlorure de carbone, oxydation par le bichromate de potasse et distillation.

Neutralisation avec le méthylorange comme indicateur :
ajouté 0,005 de méthylorange.
versé 0 cc. 6 d'eau de baryte (1 cc. eau de baryte = 0,004 H Cl).

Poids de H. Cl. correspondant $0,60 \times 0,004 = 0,0024$ H. Cl.

Ajouté 0,005 de phénolphtaléine, neutralisé exactement jusqu'à faible virage.

Evaporation du résidu :

Double pesée {	Capsule vide.....	18,178
tare à gauche {	» avec résidu.....	18,132
	Poids total du résidu....	<u>0,046</u>

(il présente une forte odeur d'acide isovalérianique).

Dosage du baryum total dans le résidu : Légère calcination, précipitation par acide sulfurique, lavage, calcination du précipité, pesée.

Double pesée {	Capsule vide.....	2,008
tare à gauche {	» avec sulfate de baryum.....	1,981
	Poids du sulfate de baryum.....	<u>0,027</u>

Baryum total : $0,027 \times 0,587 = 0,0158$.

Calcul du baryum correspondant aux acides : Il faut retrancher du baryum total le poids du baryum correspondant à la saturation de l'acide chlorhydrique trouvé ci-dessus,

$$\text{soit } \frac{0,0024 \times 137}{73} = 0,0045$$

Poids du baryum correspondant aux acides organiques :

$$0,0158 - 0,0045 = 0,0113$$

Calcul du poids de résidu se rapportant à l'acide organique : Il faut retrancher du résidu total le poids de méthylorange (0,005) ajouté, le poids de la phénolphtaléine (0,005) et le poids du chlorure de baryum.

Calcul du poids de chlorure de baryum :

$$\frac{0,0024 \times 244}{73} = 0,008$$

Poids du résidu se rapportant à l'acide organique :

$$0,046 - 0,005 - 0,005 - 0,008 = 0,028$$

Rapport du poids du sel de l'acide organique à celui du baryum :

$$\frac{0,028}{0,0113} = 2,48$$

Rapport du poids moléculaire de l'isovalérianate de baryum à celui du baryum :

$$\frac{339}{137} = 2,47$$

Les deux rapports 2,48 et 2,47 étant sensiblement égaux, il s'agit donc de l'acide isovalérianique et l'alcool oxydé est de l'alcool amylique inactif (alcool amylique de fermentation).

Dosage. — Principe de la méthode : Dumas avait signalé que l'alcool éthylique pur chauffé avec de l'acide sulfurique monohydraté ne se colore pas et qu'au contraire il fournit une coloration jaune ou brune lorsqu'il contient des aldéhydes ou des alcools supérieurs. MM. Girard et Rocques ont utilisé cette action de l'acide sulfurique pour doser les alcools supérieurs après élimination des aldéhydes par le chlorhydrate de mé-taphénylène diamine ; plus tard Mohler a proposé le phosphate d'aniline acide pour cette élimination.

Pour doser les alcools supérieurs, dans la fermentation des sucres sous l'influence des microbes du képhir, nous avons utilisé une méthode basée sur ce principe.

On compare le liquide à examiner à une solution renfermant 0,0667 d'alcool isobutylique par litre d'alcool pur. Cet alcool a été choisi parce qu'il donne la plus forte intensité colorante avec l'acide sulfurique.

Il est facile de construire des courbes de correspondance donnant la teneur pour un autre alcool (alcool amylique par exemple) en établissant le rapport des intensités colorantes, de même titre de chacun de ces alcools. (v. courbe p. 45).

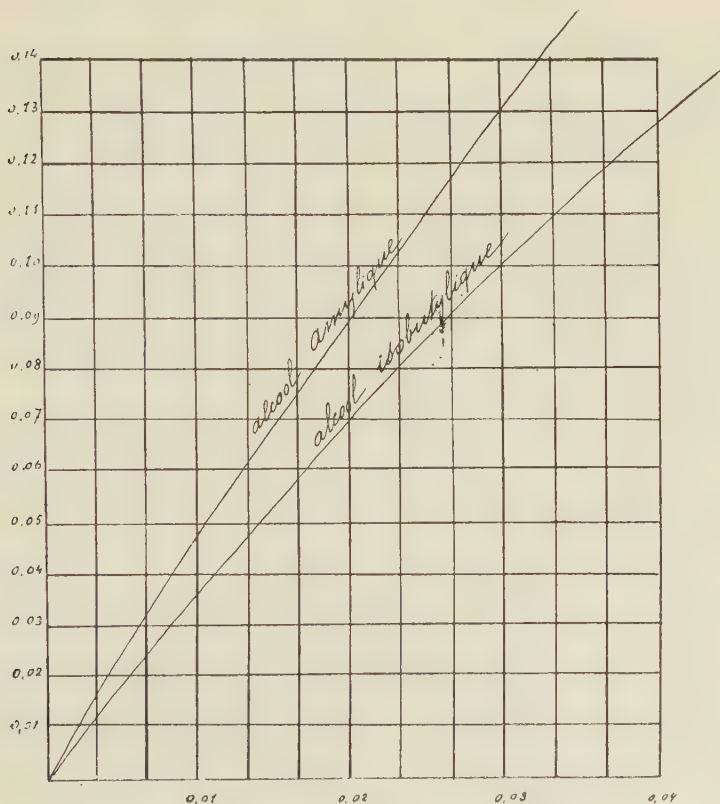
La méthode ci-dessus est peu sensible si on opère sur des liquides peu concentrés et ne s'emploie que pour les distillats de fermentation (rhum, cognac). Aussi nos essais ont porté sur notre distillat de fermentation, concentré, par distillations successives jusqu'à un degré alcoolique dix fois supérieur au degré de liquide de fermentation primitive.

MODE OPÉRATOIRE. — 400 cc. de distillat provenant du liquide de fermentation à essayer, concentré à un degré 10 fois supérieur au degré primitif et ramené au titre de 50° par addition d'eau distillée, sont placés dans un ballon de 250 cc. ; on y ajoute 1 cc. d'aniline pure et 1 cc. d'acide phosphorique sirupeux pur et quelques grains de pierre ponce ; on chauffe au réfrigérant à reflux, de manière à maintenir le liquide à une douce ébullition pendant une heure. On distille ensuite et il faut avoir soin, pour effectuer cette distillation, d'incliner le ballon à 45° environ et de le relier à un serpentín de verre par un tube assez large et terminé en biseau. Le réfrigérant doit être bien refroidi et avoir environ un mètre de longueur de manière que le liquide distillé s'écoule à la température ordinaire ; on recueille dans un ballon jaugé exactement 75 centimètres cubes de liquide, qui renferment la totalité de l'alcool qui marque par conséquent 66°,7 à l'alcoomètre. On rend ce mélange homogène par agitation. On fait agir l'acide sulfurique sur ce liquide ; pour cela on se sert de petits matras d'essayeur d'une capacité de 100 centimètres cubes et de 20 centimètres de col. On mesure 10 centimètres cubes d'alcool distillé qu'on introduit dans un matras sec, on ajoute 10 centimètres cubes d'acide sulfurique monohydraté, pur et incolore qu'on fait couler le long de la paroi du matras de manière qu'il se réunisse au fond ; on mélange ensuite vivement alcool et acide et on chauffe à 120° pendant une heure dans un bain de chlorure de calcium bouillant maintenu à un niveau constant par un ballon d'alimentation rempli d'eau.

En même temps que le liquide à essayer, on met dans le bain de chlorure de calcium un autre matras contenant 10 centimètres cubes d'une liqueur type renfermant 0,0667 d'alcool isobutylique pur par litre d'alcool pur à 66°7, on y ajoute 10 centimètres cubes d'acide sulfurique. Cette solution type a une composition telle qu'elle correspond au produit de la distillation d'une solution de 0 gr. 050 d'alcool isobutylique pur dans un litre d'alcool à 50°, la distillation étant faite en recueillant les trois quarts du liquide. De cette manière, la comparaison entre la liqueur à essayer et la liqueur type peut se faire aisément.

Quand les deux liquides ont été chauffés à 120° pendant une heure, on les laisse refroidir, puis on les compare au colorimètre, en donnant au type une épaisseur de 10 millimètres. (Bb. 78-81).

La Courbe ci-dessous construite en comparant des solutions de titre connu avec la solution type permet d'obtenir la teneur réelle en alcools supérieurs des liquides à examiner.



EXEMPLE. — Dosage des alcools supérieurs dans la fermentation des sucres (action de la levure sur la saccharose (p. 40) :

Lectures du colorimètre	Hauteur du témoin (0,066)	20 millimètres
	» de la liqueur (concentration du liquide de fermentation)	44 »

En appliquant la formule colorimétrique $\frac{H}{h} = \frac{X}{T}$

$$\text{on a } X = \frac{H \times T}{h} = \frac{0,066 \times 20}{44} = 0,030 \text{ (Titre apparent)}$$

Sur la courbe on porte la valeur de X en abscisse et on trouve en ordonnée 0,130 pour la teneur réelle de la liqueur concentrée.

Pour remonter au liquide primitif de fermentation 10 fois moins concentré, on divise par 10.

$$\text{Teneur du liquide primitif par litre} = \frac{0,130}{10} = 0,013 \text{ exprimé en alcool amylique}$$

Ethers (*dosage*). — Les hydrates alcalins attaquent les éthers, en reproduisant les alcools et les acides, que l'on sature par un excès d'hydrate alcalin. La réaction n'est complète qu'après chauffage pendant au moins une heure.

100 cc. de distillat provenant du liquide à examiner sont neutralisés par une solution décimormale de soude caustique, en se servant de la phénolphtaléine comme réactif limite. On ajoute ensuite 20 cc. de soude N/10 et après ébullition 20 cc. d'acide sulfurique N/10. On ramène à la coloration rouge de la phénolphtaléine par n cc. de soude N/10. Ces n cc. correspondent à l'alcali agissant sur les éthers.

$$0,0088 \times n \times 10 = \text{éther acétique par litre. (Bb. 22).}$$

EXEMPLE. — Dosage des éthers dans l'action de la levure sur galactose (p. 39) :

1^{er} essai : Prise de 100 cc. de distillat,
neutralisé jusqu'à virage de la phénolphtaléine,
versé 20 cc. de soude N/10,
chauffé une heure au réfrigérant ascendant,
ajouté 20 cc. d'acide sulfurique N/10,
ramené à la coloration rouge de la phénolphtaléine avec 2 cc. de soude N/10.

$$2 \times 0,0088 \times 10 = 0,176 \text{ éther acétique par litre.}$$

2^{me} essai : Contrôle :

Versé 2 cc. 1 de soude N/10 pour ramener au rouge après l'addition de 20 cc. d'acide sulfurique N/10.

$$2,1 \times 0,0088 \times 10 = 0,184 \text{ éther acétique.}$$

$$\text{Chiffre trouvé (moyenne)} \frac{0,176 + 0,184}{2} = 0,180 \text{ par litre.}$$

Aldéhydes (*dosage*) Méthode de Gayon et Schiff. — Le principe de cette méthode est basé sur un dosage colorimétrique à l'aide du réactif suivant :

A un litre d'eau distillée on ajoute :

1° 150 cc. d'une solution aqueuse, récemment préparée de fuschine à 1/1000 ;

2° 100 cc. de bisulfite de soude pur, de densité 1,360 ou 38° Baumé ;

3° 15 cc. d'acide sulfurique pur à 66°.

On agite et après quelques heures, la solution doit être limpide et complètement incolore.

On prend 4 cc. de réactif pour 10 cc. de liquide à examiner, la réaction s'effectue à froid et demande 20 minutes pour arriver au maximum de coloration.

Après ce temps elle disparaît progressivement.

D'autre part on traite de la même façon une solution de titre connu d'aldéhyde éthylique donnant une coloration d'intensité très voisine de celle que l'on examine, intensité indiquée par comparaison rapide avec trois ou quatre types de teneurs différentes, traités en même temps.

La solution à essayer et la solution type convenablement choisie sont examinées au colorimètre (il faut choisir la solution type titrée de coloration la plus voisine de celle à examiner,

la formule $\frac{H}{h} = \frac{X}{T}$ n'étant exacte que si le rapport de hauteur des liquides colorés est très proche de l'unité). (Bb. 29)

EXEMPLE (p. 40). — En même temps que le liquide de fermentation, on prépare suivant la méthode ci-dessus des tubes contenant 0 gr. 010 à 0,020 d'aldéhyde par litre. Un examen rapide sans appareil montre que la coloration du liquide à examiner se rapproche de celle du tube de teneur 0,012 par litre ; c'est ce témoin que nous prenons pour la lecture colorimétrique.

Lectures à l'appareil $\left\{ \begin{array}{l} \text{Hauteur pour le témoin...} \quad 5 \\ \text{» pour le liquide...} \quad 4 \end{array} \right.$

la formule colorimétrique donne :

$$\frac{H}{h} = \frac{X}{T} \qquad \frac{5}{4} = \frac{X}{0,012}$$

d'où $X = \frac{0,012 \times 5}{4} = 0$ gr. 015 aldéhydes par litre dans la fermentation de la saccharose.

ACTION DE LA TORULA SUR LES SUCRES

(Fermentation alcoolique)

L'action de la torula sur les sucres a été étudiée sur des milieux semblables à ceux qui ont servi pour la levure.

Après un mois de culture, l'examen du liquide a donné les résultats suivants :

Opéré sur 450 grammes	Lactose	Galactose	Glucose	Saccharose
Alcool % en volume...	0	0	0,10	0
Acidité totale, (en acide lactique)	0,94	0,26	0,83	0,46
Acidité volatile. (en acide acétique)	0,32	0,12	0,46	0,21
Sucre restant.	140	143	138	146
Poids de torula sèche..	2,30	2,90	2,20	0,90
Ethers.	traces	traces	traces	traces
Aldéhydes	traces	traces	traces	traces
Alcools supérieurs. . . .	néant	néant	néant	néant

L'acidité volatile a donné par la méthode de Duclaux la courbe de l'acide acétique. (v. p. 22).

Au cours de l'opération aucun dégagement gazeux visible ne s'est produit dans tous les ballons, mais des voiles très épais se sont formés.

ACTION DU BACILLE SUR LES SUCRES

(Fermentation alcoolique)

Rist et Khoury dans leur étude sur le Leben d'Egypte constatent que la flore est constituée par un streptobacille, un bacille grêle, un diplocoque et deux levures.

Ces levures sont incapables de faire fermenter le lactose mais les bacilles (surtout le streptobacille) dédoublent le lactose, permettant ainsi aux levures de trouver un sucre qu'elles sont capables d'attaquer ; toutefois ils n'ont pu démontrer la présence du galactose dans les produits d'une culture de streptobacille en milieu lactosé. (Bb. 69).

Guerbet, de Rouen, a trouvé dans certains Yoghourts la flore signalée par Rist et Khoury tandis que d'autres ne fermentent que le streptobacille et le diplocoque.

Ayant isolé le streptobacille, Guerbet a pu préparer avec ce seul germe un Yoghourt identique à celui obtenu avec les ferments renfermant plusieurs germes.

D'où il conclut :

1° Que l'alcool du Yoghourt est d'origine bacillaire ;

2° Que le streptobacille suffit à lui seul pour assurer la préparation du Yoghourt. (Bb. 32).

Il nous a paru intéressant en étudiant l'action du bacille sur les sucres de voir si l'alcool trouvé dans le képhir pouvait lui être attribué.

Nous avons repris le milieu qui nous a servi à l'étude de l'action de la levure (eau, sucre, peptone, phosphate d'ammoniaque, cendres de levures). Nous avons cultivé aussi le bacille dans le lait pur. Nous avons pris successivement le milieu avec lactose, galactose, glucose et saccharose.

Les flacons sont laissés un mois à l'étuve à 22°. Après ce temps de culture nous avons trouvé des traces d'alcool par la méthode Pasteur perfectionnée par A. Klöcher et par la méthode de l'iodoforme. Mais les quantités trouvées ne sont en rien comparables à celles trouvées dans le lait fermenté avec le grain de képhir.

CULTURE AVEC LE GRAIN DE KÉPHIR

	Lait	Lactose 45 %	Galactose 45 %	Glucose 45 %	Saccharose 45 %
Alcool trouvé au bout d'un mois	0°,9	0°,8	5°,20	8°,20	7°,8

CULTURE AVEC LE BACILLE

	Lait	Lactose 45 %	Galactose 45 %	Glucose 45 %	Saccharose 45 %
Alcool trouvé au bout d'un mois	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces

Le tableau ci-dessus montre que le bacille ne donne pas d'alcool en quantité appréciable et que l'alcool trouvé lorsqu'on ensemence avec le grain de képhir est dû à l'action des autres germes, soit la levure, soit le micrococcus ou par association avec levure, micrococcus ou bacille, ou bacille et micrococcus ; nous retrouverons cette étude à l'action des germes associés.

ACTION DU MICROCOCCUS SUR LES SUCRES

(Fermentation alcoolique)

Le micrococcus cultivé dans les milieux sucrés à 150 grammes par litre a donné au bout d'un mois de culture les résultats suivants :

ALCOOL TROUVÉ

LAIT	LACTOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	SACCHAROSE
Traces très faibles	Traces très faibles	Traces très faibles	Traces	Traces très faibles

ACTION DES GERMES ASSOCIÉS

SUR LES SUCRES

(Fermentation alcoolique)

La levure ne produisant aucune fermentation avec le lactose, aucun germe seul ne donnant de l'alcool avec ce sucre, nous avons cherché si par association on pouvait transformer du lactose en alcool. Nous avons pris une série de ballons contenant une solution de lactose peptonée stérilisée semblable à celle qui nous a servi précédemment aux expériences de fermentation. Nous ensemençons dans tous ces ballons de la levure et nous la faisons développer pendant 15 jours à la

température de 20°. Lorsqu'il y a un dépôt abondant de levure, nous ajoutons dans un premier ballon de la torula, dans un deuxième du bacille, dans un troisième du micrococcus et nous laissons un mois à l'étuve à 20°.

Pendant toute la durée de l'expérience aucune fermentation visible ne s'est produite dans le ballon contenant le micrococcus, une fermentation lente mais nette s'est produite dans le ballon contenant le bacille, une fermentation très faible dans le ballon avec la torula.

ALCOOL TROUVÉ

Témoin LEVURE	Témoin TORULA	Témoin BACILLE	Témoin MICROCOCCUS
Néant	Néant	Fortes traces	Très faibles traces
LEVURE & TORULA		LEVURE & BACILLE	LEVURE & MICROCOCCUS
0°,2		0°,7	Traces
TORULA & BACILLE		TORULA & MICROCOCCUS	BACILLE & MICROCOCCUS
Fortes traces		Traces	Traces

Nous avons associé d'autre part la torula avec le bacille et le micrococcus et ces deux derniers microbes entre eux. Les liquides de culture lactosés ne contenaient que des traces d'alcool.

Cette expérience semble prouver que la fermentation alcoolique du képhir très faible est due à l'association du bacille et de la levure, le bacille intervertit le sucre de lait et la levure fait fermenter le glucose et le galactose. Nous n'avons pu former dans le liquide de fermentation aucune osazone, les sucres provenant de l'intervention du lactose paraissent donc consommés dès leur formation.

La méthode de culture en anaérobiose forcée (sur milieu faiblement gélatiné) ne nous a pas permis d'obtenir la fermentation du lactose avec aucun des germes.

ACTION DU BACILLE SUR LES SUCRES

(Fermentation lactique)

Le milieu nutritif qui a servi aux expériences a été préparé de la façon suivante :

Peptone.....	4
Lactose.....	5
Craie.....	10
Eau.....	100

On ajoute le lactose en quantité absolument exacte par addition d'une quantité connue de solution concentrée et titrée de lactose pur. La recherche et le dosage de l'acide fixe formé a été faite sur le liquide de culture concentré à la consistance de sirop, on additionne d'une quantité d'acide sulfurique juste suffisante pour précipiter la chaux, on épuise l'acide libre par l'éther.

Le procédé pour caractériser et différencier les acides lactiques qui pouvaient se former au cours de l'expérience a été :

1° La réaction d'Uffelmann modifiée par Berg pour rechercher les acides-alcools (Bb. 79) ;

2° L'examen des sels de zinc et la mesure de leur perte d'eau après triple cristallisation ;

3° La recherche du pouvoir rotatoire.

A) Lactose

PREMIÈRE EXPÉRIENCE : MILIEU AÉROBIE

On prend un ballon contenant une quantité suffisante de milieu de culture pour représenter exactement 25 grammes de lactose, on laisse à l'étuve à 30° pendant 20 jours, au bout de ces trois semaines de culture on examine le liquide.

Acidité fixe (en acide lactique)....	23,10 grammes
Acidité volatile (en acide acétique)....	0,30 gramme
Sucre restant.....	0,10 gramme
Sucre disparu (par différence)....	24,90 grammes

Pour obtenir l'acide lactique on filtre le liquide et on le concentre à un faible volume, puis on l'épuise par l'éther après addition d'acide sulfurique.

L'éther est distillé et le résidu chauffé au bain-marie pour chasser les acides volatils.

L'acide lactique est repris par l'eau, porté à l'ébullition et

concentré. A l'essai polarimétrique cet acide ne donne pas de déviation. Une portion du liquide lactique a été neutralisée par du carbonate de zinc, la solution de lactate de zinc examinée au polarimètre ne donne pas de déviation.

On évapore ensuite un volume donné de solution et après trois cristallisations successives dans l'eau, les cristaux de lactate sont portés à l'étuve à 160° pour doser l'eau de cristallisation qu'ils renferment.

Perte d'eau % de lactate de zinc.....	18,25
Pouvoir rotatoire.....	0

L'acide lactique est donc inactif.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE : *MILIEU ANARÉOBIE*

Dans un flacon d'Erlenmayer on verse la même quantité de milieu de culture correspondant à 25 grammes de lactose, on y ajoute une couche de lanoline neutre suffisante pour recouvrir complètement le liquide et on porte à l'autoclave à 120° pendant une heure.

Après refroidissement le flacon a été chauffé au bain-marie jusqu'à liquéfaction de la lanoline et ensemencé.

Après un passage de trois semaines à l'étuve, l'examen du liquide a donné :

Acidité fixe (en acide lactique)....	24,20 grammes
Acidité volatile (en acide acétique).	0,60 gramme
Sucre restant.....	néant
Sucre disparu (par différence).....	25 grammes

L'acide obtenu est inactif sur la lumière polarisée. Le sel de zinc purifié donne :

Perte d'eau % de lactate de zinc.....	18,01
Pouvoir rotatoire.....	0

En milieu anaérobie la disparition du sucre paraît donc plus complète, la production d'acidité volatile moindre.

B) **Galactose**

PREMIÈRE EXPÉRIENCE : *MILIEU AÉROBIE*

Après trois semaines de culture les résultats ont été les suivants :

Acidité fixe (en acide lactique)....	22,15 grammes
Acidité volatile (en acide acétique).	0,22 gramme
Sucre restant.....	0,92 gramme
Sucre disparu (par différence).....	24,08 grammes
Perte d'eau % de lactate de zinc...	18,02
Pouvoir rotatoire.....	0

DEUXIÈME EXPÉRIENCE : *MILIEU ANAÉROBIE*

Après trois semaines de culture :

Acidité fixe (en acide lactique)....	23,40 grammes
Acidité volatile (en acide acétique).	0,15 gramme
Sucre restant.....	0,10 gramme
Sucre disparu (par différence)....	24,90 grammes
Perte d'eau % de lactate de zinc...	17,90
Pouvoir rotatoire.....	0

L'acide est inactif sur la lumière polarisée.

C) Glucose

PREMIÈRE EXPÉRIENCE : *MILIEU AÉROBIE*

Acidité fixe (en acide lactique)....	23,70 grammes
Acidité volatile (en acide acétique).	0,60 gramme
Sucre restant.....	0,30 gramme
Sucre disparu (par différence)....	24,70 grammes
Perte d'eau % de lactate de zinc...	18,35
Pouvoir rotatoire.....	0

DEUXIÈME EXPÉRIENCE : *MILIEU ANAÉROBIE*

Acidité fixe (en acide lactique)....	24,30 grammes
Acidité volatile (en acide acétique).	0,12 gramme
Sucre restant.....	0 gramme
Sucre disparu (par différence)....	25 grammes
Perte d'eau % de lactate de zinc...	18,05
Pouvoir rotatoire.....	0

D) Saccharose

PREMIÈRE EXPÉRIENCE : *MILIEU AÉROBIE*

Acidité fixe (en acide lactique)....	23,70 grammes
Acidité volatile (en acide acétique).	0,40 gramme
Sucre restant.....	0,50 gramme
Sucre disparu (par différence)....	24,50 grammes
Perte d'eau % de lactate de zinc....	18,75
Pouvoir rotatoire.....	0

DEUXIÈME EXPÉRIENCE : *MILIEU ANAÉROBIE*

Acidité fixe (en acide lactique)....	24,10 grammes
Acidité volatile (en acide acétique).	0,25 gramme
Sucre restant.....	0 gramme
Sucre disparu (par différence)....	25 grammes
Perte d'eau % de lactate de zinc...	18,32
Pouvoir rotatoire.....	0

L'ensemble des expériences ci-dessus indique, qu'en présence de craie, le bacille se conduit comme un ferment extrême-

ment actif transformant intégralement les principaux sucres qu'il peut rencontrer dans le lait et le saccharose. En présence de peptone il a toujours donné de l'acide inactif sur la lumière polarisée. Son action est aussi forte, peut-être même plus forte en milieu anaérobie, ce qui n'a pas lieu de nous surprendre, ce microbe vivant dans le lait chargé d'acide carbonique par la fermentation alcoolique, et la couche de beurre formant protection contre l'oxygène de l'air en culture courante dans la fabrication du képhir. Cette observation confirme les propriétés anaérobies du bacille constatées dans l'isolement des germes sur plaques de gélose exposées à l'air et sa culture rapide par la méthode de Liborius-Veillon.

TABLEAU RÉCAPITULATIF (Action du Bacille sur les Sucres)

<i>Avec 25 grammes de sucre dans 500 cc. en milieu aérobie</i>				
	Lactose	Galactose	Glucose	Saccharose
Acidité fixe..... (en acide lactique)	23,10	22,15	23,70	23,70
Acidité volatile..... (en acide acétique)	0,30	0,22	0,60	0,40
Sucre restant.....	0,10	0,92	0,30	0,50
Sucre consommé..... (par différence)	24,90	24,08	24,70	24,50
Pouvoir rotatoire..... (de l'acide lactique)	0	0	0	0
Sel de zinc {	Perte d'eau % de lactate	18,25	18,02	18,35
	Pouvoir rotatoire.	0	0	0
<i>Avec 25 grammes de sucre dans 500 cc. en milieu anaérobie</i>				
	Lactose	Galactose	Glucose	Saccharose
Acidité fixe..... (en acide lactique)	24,20	23,40	24,30	24,10
Acidité volatile..... (en acide acétique)	0,60	0,15	0,12	0,25
Sucre restant.....	0	0,10	0	0
Sucre consommé..... (par différence)	25	24,90	25	25
Pouvoir rotatoire..... (de l'acide lactique)	0	0	0	0
Sel de zinc {	Perte d'eau % de lactate	18,01	17,90	18,05
	Pouvoir rotatoire.	0	0	0

ACTION DU MICROCOCCUS SUR LES SUCRES

(Fermentation lactique)

Les essais effectués sur le bacille pour l'étude de la fermentation lactique des sucres ont été répétés avec le micrococcus, les résultats après trois semaines de culture ont été les suivants :

<i>Avec 25 grammes de sucre dans 500 cc. en milieu aérobie</i>				
	Lactose	Galactose	Glucose	Saccharose
Acidité fixe..... (en acide lactique)	3,10	2,40	5,70	2,20
Acidité volatile..... (en acide acétique)	0,35	0,60	0,48	0,29
Sucre restant.....	10,20	20,10	8,30	22,40
Sucre consommé..... (par différence)	4,80	4,90	16,70	2,60
Pouvoir rotatoire. (de l'acide lactique)	0	0	0	0
Sel { Perte d'eau % de				
de zinc { lactate	18,16	18,43	18,60	18,32
{ Pouvoir rotatoire.	0	0	0	0
<i>Avec 25 grammes de sucre dans 500 cc. en milieu anaérobie</i>				
	Lactose	Galactose	Glucose	Saccharose
Acidité fixe..... (en acide lactique)	4,30	5,32	6,90	2,20
Acidité volatile..... (en acide acétique)	0,25	0,40	0,30	0,15
Sucre restant.....	18,68	15,69	16,90	20,90
Sucre consommé..... (par différence)	6,32	9,31	8,80	4,10
Pouvoir rotatoire..... (de l'acide lactique)	0	0	0	0
Sel { Perte d'eau % de				
de zinc { lactate	18,40	18,10	18,20	17,99
{ Pouvoir rotatoire.	0	0	0	0

Le micrococcus au point de vue activité du ferment lactique est bien inférieur au bacille et peut être classé dans les ferments lactiques faibles qui transforment difficilement tout le sucre mis à leur disposition.

ACTION DU MICROCOCCUS SUR LES SUCRES

Production de matière visqueuse (Bb. 9-22-42-49)

Nous préparons les trois milieux suivants :

	N° 1	N° 2	N° 3
Eau	100	100	100
Peptone.....	1	1	1
Cendres de levure .	1	1	1
Saccharose.....	15	Lactose. 15	Glucose. 15

Après ensemencement avec le micrococcus, nous mettons les cultures à l'étuve à 22°. Au bout d'un mois le liquide est envahi par une énorme masse blanchâtre visqueuse et floconneuse. Il ne se produit aucun dégagement gazeux visible pendant l'opération.

On filtre le liquide, on lave à l'eau et à l'alcool.

L'analyse a donné les résultats suivants :

	N° 1	N° 2	N° 3
Milieu aérobie { Insoluble (matières visqueuses)	4,5 %	3,2 %	1,3 %
{ Alcool.....	traces	traces	traces
{ Acide lactique.....	0,90 %	0,75 %	0,76 %
{ Acide acétique	0,057 %	0,070 %	0,065 %

Nous n'avons pas trouvé de mannite.

La matière insoluble présentait la composition suivante :

Matières azotées calculées en matières albuminoïdes (d'après le taux de l'azote trouvé, en prenant pour base 16 % d'azote dans les matières albuminoïdes).....	2,6 %	de matières séchées à 100°.
Cendres	0,6 %	»
Matières grasses	traces	»
» hydrocarbonnées. (p. diff.).	96,8 %	»

L'analyse élémentaire a donné :

Carbone	42,37
Hydrogène.....	7,73
Oxygène.....	48,87

L'azote peut provenir des corps de microbes forcément emprisonnés dans la matière visqueuse qu'ils ont secrétée ; il peut provenir aussi des peptones du milieu, entraînées dans le préci-

pité de la matière visqueuse. C'est pour cette raison que nous exprimons en matières albuminoïdes.

Retranchons du chiffre trouvé à l'analyse élémentaire pour le carbone, l'hydrogène et l'oxygène, le chiffre qui correspondrait aux carbone, hydrogène et oxygène renfermés dans 2,6 % de matières albuminoïdes que contient vraisemblablement le produit d'après sa teneur en azote (nous supposons pour ce calcul que la matière albuminoïde contient : carbone 53 %, hydrogène 7,5 % et oxygène 21 %).

Les nombres trouvés après cette soustraction correspondraient aux 96,8 % de matière hydrocarbonée si notre hypothèse de la présence de la matière albuminoïde est exacte ; en rapportant à 100 de cette matière hydrocarbonée, nous trouvons les résultats ci-dessous qui rapprochent notre corps du dextrane (si on compare aux chiffres donnés par la théorie pour 100 de dextrane).

Pour les dextranes $(C^6 H^{10} O^5)^n$ en supposant $n = 1$:

$$\begin{array}{ll} \text{Carbone.....} & (C^6 = 12 \times 6 = 72) = \frac{72 \times 100}{162} = 44.40 \\ \text{Hydrogène} & (H^{10} = 10 \times 1 = 10) = \frac{10 \times 100}{162} = 6.17 \\ \text{Oxygène.....} & (O^5 = 16 \times 5 = 80) = \frac{80 \times 100}{162} = 49.80 \end{array}$$

Pour le corps trouvé :

$$\begin{array}{ll} \text{Carbone.....} & \frac{\left(42,37 - \left(\frac{2,6 \times 53}{100}\right)\right) 100}{96,8} = 42,35 \\ \text{Hydrogène.....} & \frac{\left(7,73 - \left(\frac{2,6 \times 7,5}{100}\right)\right) 100}{96,8} = 7,70 \\ \text{Oxygène} & \frac{\left(48,87 - \left(\frac{2,6 \times 21}{100}\right)\right) 100}{96,8} = 49,92 \end{array}$$

La matière trouvée se gonfle au contact de l'eau sans se dissoudre, elle n'agit pas sur la liqueur cupro-potassique, elle se dissout dans les alcalis un peu dilués. L'iode ne produit aucune coloration. La matière est insoluble dans l'alcool, l'éther, la benzine, le chloroforme, le sulfure de carbone, de même que dans le réactif de Schweitzer où elle gonfle énormément.

Soumise à l'action d'une très faible quantité d'acide, elle prend un fort pouvoir réducteur. Après ébullition, examinée au polarimètre une solution à 1 % (0,50 dans 50 cc.) donne au tube de 20 cms une déviation de $+1^{\circ}12$; pouvoir rotatoire sensiblement égal à celui du glucose.

Avec la phénylhydrazine elle donne un phénylglucosazone fusible à 230° .

Notre microbe diffère du *Gommobacter* dont Fernbach et Schœn viennent de publier les propriétés. (Bb. 24). Notre micrococcus ne dégage pas de gaz en quantité appréciable, de plus il donne une dextrane tandis que celui de ces auteurs donne une lévulane. Mais comme pour le *Gommobacter* son activité est maximum avec le saccharose et les poids de gomme produits sont sensiblement de même ordre.

Nous avons répété les mêmes expériences, toutes conditions identiques, mais en milieu anaérobie.

Les résultats ont été les suivants :

	Saccharose	Lactose	Glucose
	45 %	45 %	45 %
MILIEUX	N° 1	N° 2	N° 3
Matières visqueuses insolubles	5,7 %	3,9 %	1,2 %
Alcool	traces très faibles		
Acide lactique	0,88 %	0,75 %	0,80 %
Acide acétique	0,03 %	0,01 %	0,05 %

Le micrococcus paraît aussi actif en milieu anaérobie, peut-être même plus, seule la production de l'acide acétique paraît diminuer.

RECHERCHE DE LA LACTASE

Ce ferment soluble possède la propriété d'hydrolyser le sucre de lait en glucose et galactose. Les travaux de Fischer ont démontré que le grain de képhir contient de la lactase, quel est celui de ses germes qui la sécrète ? (Bb. 26).

Nos expériences ont porté sur le grain de képhir brut, sur la levure, le bacille, la torula et le micrococcus. Pour cela, pour chacun de ces produits nous avons utilisé la méthode suivante de préparation de liquide diastasifère :

5 grammes de matière sont desséchés dans le vide, on triture ensuite avec de la poudre de verre et de sable, puis on met à macérer dans de l'eau chargée de toluène, 24 heures à la température de 15° à 20° ; la macération est pressée et filtrée. L'expérience a été pratiquée de la façon suivante : technique de M. Bourquelot. (Bb. 12).

TUBE N° 1 TÉMOIN	TUBE N° 2 TÉMOIN
Macération 50 cc.	Macération bouillie 50 cc.
Lactose 0 gr.	Lactose 0 gr.
Toluène 0,5 cc.	Toluène 0,5 cc.

TUBE N° 3	TUBE N° 4 TÉMOIN
Macération 50 cc.	Macération bouillie 50 cc.
Lactose 5 gr.	Lactose 5 gr.
Toluène 0,5 cc.	Toluène 0,5 cc.

La présence de la lactase a été démontrée :

I. Par le Polarimètre :

La rotation d'une solution de lactose augmente quand ce sucre est hydrolysé ; cette augmentation permet de calculer quelle a été l'importance du dédoublement. Quand l'hydrolyse

est peu avancée, la déviation est très faible, aussi est-il utile avant de conclure de contrôler l'expérience par les deux procédés suivants.

II. *Méthode de Fischer* (Bb. 26) :

Fischer utilise, pour rechercher la lactase, la propriété que possède la phényllactosazone d'être soluble à 1/80 dans l'eau bouillante alors que la phénylglucosazone et la phénylgalactosazone y sont à peine solubles.

La technique est basée sur l'emploi de la phénylhydrazine pour la détermination des sucres, selon le mode opératoire donné par Maquenne. (Bb. 56).

Nous avons pris pour chacun des quatre essais :

20 cc. de macération correspondant à 2 gr. de lactose,

2 cc. de phénylhydrazine fraîchement redistillée,

2 cc. d'acide acétique cristallisable,

2 gr. d'acétate de soude cristallisé,

porté le volume à 100 cc. et laissé le tout au bain-marie bouillant pendant 1 heure $\frac{1}{2}$.

Après un repos de 24 heures les osazones sont recueillies sur un filtre sans pli, lavées avec 5 cc. d'eau distillée froide pour éliminer l'excès de phénylhydrazine. Le précipité est alors chassé à l'aide de 150 cc. d'eau distillée chaude dans un flacon d'Erlenmayer, le tout est porté à l'ébullition.

Les osazones insolubles sont lavées sur un filtre taré avec 50 cc. d'eau bouillante pour éliminer les dernières traces de lactosazone. La pesée est faite après dessiccation à 110°-115°.

Les expériences de Brachin ont montré qu'il est impossible de déceler un dédoublement inférieur à 20 %. Toutefois à partir d'une hydrolyse de 20 % alors que la déviation polarimétrique n'est que de quelques minutes, la proportion d'osazones insolubles est suffisante pour donner une certitude absolue. (Bb. 15).

III. *Méthode Iodométrique* :

Römjn a donné une méthode de dosage des sucres aldéhydiques en utilisant l'action oxydante de l'iode sur les sucres aldéhydiques. Brachin a appliqué ce procédé à la recherche de la lactase en s'appuyant sur le principe suivant :

Le lactose qui ne renferme qu'une fonction aldéhydique terminale s'oxyde pour donner l'acide lactobionique et pour cela 360 de lactose hydratent absolument 254 d'iode.

Après interversion totale du lactose on aura un mélange

formé à partie égale de glucose et de galactose ; pour 360 de ce mélange il existera deux fonctions aldéhydiques et pour en produire la transformation en acide gluconique et acide galactonique il faudra 508 d'iode.

La réaction est effectuée en présence d'un excès d'iode ; le métalloïde restant est dosé à l'hyposulfite et par différence on a la proportion d'iode absorbée. On prépare une solution d'iode à 40 gr. par litre et une solution d'hyposulfite équivalente.

Pour rendre la liqueur alcaline on opère en présence du borax ; mais l'iode réagissant sur le borax dissocié en présence de l'eau donne un hypoiodite qui ne tarde pas à se transformer en iodate et iodure. L'oxydation doit donc se faire à basse température et comme il est à peu près impossible d'empêcher la réaction de se produire, il faudra provoquer lors du dosage la décomposition de l'iodate et de l'iodure par addition d'acide chlorhydrique ; sans cette précaution l'iodure et l'iodate seraient considérés comme ayant servi à produire l'oxydation du sucre.

Pour chaque expérience nous avons préparé un mélange contenant les proportions suivantes de sucre, borax, iode et eau :

Solution de borax à 1 pour 25...	48 cc.
Macération lactosée à 10 %.....	2 »
Solution d'iode à 1 %.....	50 »
Eau	400 »

Après 24 heures l'iode restant a été dosé en opérant sur 450 cc. de la solution ci-dessus, soit 0,450 lactose, après avoir ajouté 5 cc. d'acide chlorhydrique. L'action des matières albuminoïdes et autres corps oxydables provenant de la source du ferment modifie très sensiblement les résultats, c'est pourquoi nous avons fait une comparaison avec un tube témoin où la lactose a dû rester inaltérée. (Bb. 71).

Les résultats des trois méthodes ont été consignés dans le tableau ci-après.

MÉTHODE POLARIMÉTRIQUE	KÉPIHR	BACILLE	LEVURE	TORULA	MICROCOCBUS
Tube N° 1 (Témoin) : Macération sans lactose Déviation +	0° 37'	0° 14'	0° 59'	0° 22'	0° 26'
Tube N° 2 (Témoin) : Macération bouillie sans lactose Déviation +	0° 40'	0° 16°	0° 55'	0° 18'	0° 24'
Différence	3'	2'	4'	4'	2'
Tube N° 3 : Macération avec 5 gr. lactose p. 50 cc. Déviation +	10° 35'	10° 55'	10° 15'	10° 20'	10° 12'
Tube N° 4 (Témoin) : Macération bouillie avec 5 gr. lactose p. 50 cc. Déviation +	10°	10° 8'	10° 12'	10° 15'	10° 16'
Différence	35'	47'	3'	5'	4'

MÉTHODE DE FISCHER					
Tube N° 1 (Témoin) : Macération sans lactose Poids d'osazones insolubles	traces	traces	0 gr. 01	traces	traces
Tube N° 2 (Témoin) : Macération bouillie sans lactose Poids d'osazones insolubles	0	0	0	0	traces
Tube N° 3 : Macération avec 5 gr. lactose p. 50 cc. Poids d'osazones insolubles	1 gr. 70	2 gr. 20	0 gr. 15	0 gr. 20	0 gr. 09
Tube N° 4 (Témoin) : Macération bouillie avec 5 gr. lactose p. 50 cc. Poids d'osazones insolubles	0	0	0	0	0

MÉTHODE DE ROMIJN					
Tube N° 3 : Macération avec 5 gr. lactose p. 50 cc. (en opérant sur 0,15 lactose) Iode fixé (Macération non filtrée) »	360 milligr.	344 milligr.	291 milligr.	290 milligr.	270 milligr.
Tube N° 4 (Témoin) : Macération bouillie avec 5 gr. lactose p. 50 cc. (en opérant sur 0,15 lactose) Iode fixé (Macération bouillie non filtrée) »	328 »	290 »	289 »	292 »	266 »
Différence	32 milligr.	54 milligr.	2 milligr.	2 milligr.	4 milligr.

La série d'expériences ci-dessus indique que le grain de képhir contient de la lactase, et que seul le bacille paraît en sécréter d'une façon appréciable ; les trois autres germes : levure, torula et micrococcus paraissant inactifs au point de vue hydrolisant sur le lactose.

Cet essai confirme encore l'inactivité de la levure sur le lactose au point de vue de la production de l'alcool, et son activité lorsqu'elle se trouve associée au bacille, comme dans le képhir, le bacille hydrolisant le lactose et la levure agissant alors sur le glucose et le galactose.

RECHERCHE DE LA SÉCRÉTION DE LA LIPASE

(Bb. 17-22)

La matière grasse d'un lait aussi frais que possible est séparée par centrifugation. Cette matière grasse dissoute dans l'éther est filtrée, on lave à l'eau pour enlever toute trace de sucre et on dessèche dans le vide, puis on stérilise à l'autoclave à 115°.

Nos premières expériences ont été faites avec une quantité de matière grasse correspondant aux proportions renfermées dans le lait. Les résultats n'étant pas facilement mesurables nous avons opéré de la façon suivante :

A 30 grammes de matière grasse purifiée et stérile on ajoute aseptiquement 100 cc. d'eau peptonisée à 1 % contenant des traces de savon pour faciliter une émulsion, le tout est parfaitement neutralisé. On ensemence avec la levure un ballon 1, avec la torula un ballon 2, avec le bacille un ballon 3, avec le micrococcus un ballon 4. On ferme hermétiquement les ballons remplis de gaz carbonique pour éviter l'action de l'oxygène de l'air ; on met à l'étuve à 25° et à l'obscurité pour éviter l'action de la lumière, et en même temps on joint un ballon témoin à chacun des essais.

D'autre part, on prépare exactement de la même façon une série de ballons avec 4 pour 1000 d'acide lactique :

Ballon 1L, Ballon 2L, Ballon 3L, Ballon 4L.

Ces ballons témoins servent à vérifier si l'acide lactique ne modifie pas la réaction, comme cela peut se produire dans du lait dont le sucre est attaqué par les germes du képhir.

Après six mois de culture, on observe que la matière grasse a pris dans les ballons 1 et 2 un aspect granuleux, mamelonné, tout-à-fait différent de celui des témoins et des ballons à acide lactique, dans lesquels la matière grasse forme une couche lisse compacte.

Pour établir si les matières grasses ont été touchées, nous avons dosé l'acidité au départ et à la fin de l'expérience sur une partie aliquote en la dissolvant dans l'alcool absolu neutre, on rapporte ensuite à 1000. Pour les expériences sur les ballons ne contenant pas d'acide lactique, nous avons fait usage de la potasse centinormale pour nos dosages.

		Acidité primitive exprimée en acide lactique ‰	Acidité finale exprimée en acide lactique ‰
Levure.....	Ballon 1.....	0	0,08
	Ballon 1 L....	4	4,08
	Témoin.....	0	0,01
Torula.....	Ballon 2.....	0	0,09
	Ballon 2 L....	4	4,03
	Témoin.....	0	0,02
Bacille.....	Ballon 3.....	0	0,03
	Ballon 3 L....	4	4,01
	Témoin.....	0	0,02
Micrococcus.	Ballon 4.....	0	0,02
	Ballon 4 L ...	4	4,06
	Témoin.....	0	0,03

Le tableau montre que seules la levure et la torula ont une action sur la matière grasse, action faible et lente en milieu neutre seulement. Le bacille et le micrococcus peuvent être considérés comme inactifs.

RECHERCHE DE LA PRODUCTION DE PRESURE PAR LA LEVURE

La levure provenant d'une culture pure sur gélose lactosée estensemencée dans du lait stérilisé. On laisse le ballon scellé à l'obscurité à la température de 25° pendant douze mois. Il s'est formé un abondant dépôt de levure et quelques cristaux de tyrosine, le liquide est alcalin et contient de l'ammoniaque.

Au cours de l'expérience, le lait est examiné fréquemment, jamais une coagulation ne s'est manifestée. Le lait présente l'aspect du lait stérilisé maintenu le même temps dans la même étuve, avec cette différence que la matière grasse est par paquets en grumeaux dans le ballonensemencé avec la levure.

Si on porte le lait où a vécu la levure, à une température de 35 à 40°, on n'observe aucune coagulation, le lait reste inaltéré.

Comme il aurait pu se produire une coagulation fine passée inaperçue et digestion de la caséine, nous avons ajouté quelques gouttes d'acide acétique et chauffé. Nous obtenons avec le lait maintenu au contact de la levure, un précipité de caséine semblable à celui obtenu avec le lait témoin stérilisé.

Précipité de caséine sèche obtenu par chauffage en milieu acétique :

Précipité de caséine sèche obtenu par chauffage en milieu acétique

Lait avec levure

Témoin

—
2,2 %

—
2,8 %

Pendant un contact de douze mois la levure n'a donc secrété aucune quantité notable de présure, ni de caséase, et la caséine non digérée a conservé les mêmes propriétés que dans le lait témoin.

RECHERCHE DE LA PRODUCTION DE PRÉSURE PAR LE BACILLE (Bb. 22)

Le bacille produisant de l'acide lactique, il y avait lieu d'établir si la coagulation du lait était dûe uniquement à l'action de cet acide ou à la présence de présure secrétée par le microbe.

Nous avons repris une expérience classique de Freudenreich qui consiste à faire développer le microbe dans le lait en présence de carbonate chaux pulvérisé pour neutraliser l'acide au fur et à mesure de sa production. Le lait laissé à la température de 25° a coagulé au bout de 15 jours. Si on élève la température à 37°, vers le quatrième jour la coagulation se produit. (Bb. 27).

Cette expérience démontre que le lait en présence du microbe coagule sous l'action d'un corps autre que l'acide lactique libre, ce dernier étant saturé par la craie dès sa formation. Ce corps pouvait être soit la présure, soit le lactate de chaux formé (lequel coagule le lait au bout de 12 heures dans la proportion de 12 %. — Observation personnelle).

La durée de l'expérience pouvait faire craindre que le phénomène de la coagulation ne soit pas dû à l'action d'une diastase, mais il y a lieu de tenir compte de ce que le microbe met un certain temps à produire ce corps actif et que sa diffusion dans le liquide n'est pas instantanée.

Nous avons repris une deuxième série d'expériences avec des tubes témoins contenant du lait stérilisé additionné de doses différentes de lactate de chaux.

TEMPÉRATURE D'EXPÉRIENCE : 37°						
Durée de l'expérience...	12 heures	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	
Bacille, lait et craie..	Pas de coagulation	Pas de coagulation	Pas de coagulation	Pas de coagulation	Coagulation	
Lait stérile avec lactate de chaux	1 %...	d°	d°	d°	d°	Pas de coagulation
	2 %...	d°	d°	d°	d°	d°
	3 %...	d°	d°	d°	d°	d°
	4 %...	d°	d°	d°	d°	d°
	5 %...	d°	d°	d°	d°	d°
	6 %...	d°	d°	d°	d°	d°

Comme le montre le tableau, dans le liquide contenant le bacille il y a coagulation le quatrième jour, tandis que dans les ballons contenant de très fortes doses de lactate de chaux, rien ne s'est produit ; on ne peut donc attribuer la coagulation qu'à la sécrétion de présure par le bacille, ce dernier produisant des doses de lactate bien inférieures à celles des témoins qui n'ont subi aucun changement.

Une autre série d'expériences a été faite pour établir si le corps actif agissait en présence d'acide lactique et si le lait coagulait plus vite avec le bacille qu'avec l'acide lactique seul agissant sur du lait aseptique.

On prend des tubes de lait stérilisé, on y ajoute aseptiquement des doses faibles d'une solution d'acide lactique de façon à obtenir une acidité voisine de celle formée par le bacille dans le lait. On met à l'étuve à 35° en même temps qu'un tube ensemencé avec le bacille.

Après 72 heures d'expérience, on constate que le tube au bacille coagule ainsi que plusieurs tubes à acide lactique stérilisés.

Lait : Tube avec Bacille		Lait : Tubes stériles avec acide lactique libre	
Acidité finale	Coagulation	Acidité finale	Coagulation
2,3 %	Positive après 72 heures	1 %	Négative après 72 heures d°
		2 %	
		2,5 %	
		3 %	Positive après 48 heures d°
		3,5 %	
		4 %	
		4,5 %	
		5 %	d°

Le tableau montre que la coagulation se produit pour une acidité inférieure dans le tube au bacille, le tube à acide lactique stérile ne coagulant pas au bout de 72 heures pour une acidité de 2,5 %.

Pour voir s'il s'agissait d'une diastase, nous avons pris le lait du tube au bacille et nous l'avons concentré de moitié au bain-marie à 100°, stérilisé à l'autoclave à 115° ; nous avons ramené le tube au volume primitif avec du lait stérile pour obtenir une acidité de 2,3 %. Nous avons laissé à l'étuve à 35°

pendant 72 heures. Aucune coagulation ne s'est produite. La substance active était ou volatile ou tuée par la chaleur.

Nous avons répété l'expérience en évaporant par distillation à 35° sous pression réduite, et d'autre part dans le vide en présence d'acide phosphorique, les deux liquides obtenus ramenés au volume primitif avec du lait stérile ont donné au bout de 19 heures, une coagulation pour une température de 40°. Il s'agit donc d'une substance qui devient inactive après l'action de la chaleur à 100°.

RECHERCHE DE LA PRODUCTION DE PRESURE PAR LE MICROCOCCUS

Nous avons repris les expériences de recherche de présure avec le micrococcus en présence de carbonate de chaux, la coagulation se produit au bout de 15 jours à la température de 25°.

Les deux expériences suivantes pouvant démontrer que le micrococcus coagulait le lait avant que la dose d'acide soit suffisante pour le faire, et que la coagulation était due à un corps autre que l'acide lactique ont donné les résultats ci-dessous.

Lait : Avec Micrococcus		Lait : Tubes stériles avec acide lactique libre	
Acidité finale	Coagulation	Acidité finale	Coagulation
2,65 %	Positive le 5 ^{me} jour	1 %	Négative après 5 jours
		2 %	do
		2,5 %	do
		2,6 %	do
		2,7 %	do
		2,8 %	do
		2,9 %	do
		3 %	Positive après 48 heures

ACTION SUR LES ALBUMINOÏDES

(Bb. 9-17-20-22-34-48)

Prenons du képhir préparé avec du lait écrémé, pour ne pas être gêné par la matière grasse, et qui a subi une fermentation de plusieurs mois. Précipitons la caséine et les albumoses, le liquide ainsi obtenu donne très nettement la réaction du biuret, ce qui indique comme plusieurs auteurs l'ont déjà démontré que les matières albuminoïdes du lait ont subi un commencement de dégradation et ont été peptonisées.

Si nous recherchons la tyrosine, en neutralisant par un lait de chaux une partie du liquide obtenu comme ci-dessus, concentrant la liqueur jusqu'à un faible volume et acidifiant par l'acide azotique, on obtient des cristaux qui se séparent lentement. On les purifie par l'alcool ammoniacal.

Si d'autre part on emploie la méthode d'Ulrich en faisant cristalliser sur une même plaque de verre une quantité suffisante du liquide ci-dessus, on finit par obtenir quelques cristallisations de fines aiguilles réunies en houppe ou en gerbe et légèrement colorées en jaune. (Bb. 80).

Dans les deux cas, le produit obtenu est insoluble dans l'acide azotique mais soluble dans l'ammoniaque et l'acide chlorhydrique. La solution de ce produit additionnée à chaud de nitrate de mercure et chargée d'un léger excès d'acide, donne un précipité jaune clair ; si on laisse tomber goutte à goutte dans le mélange bouillant de l'eau aiguisée d'acide nitrique fumant nitreux, le précipité diminue de volume et devient rouge. (Bb. 7).

Ces cristaux donnent également la réaction de la tyrosine avec le réactif de Millon et la réaction rouge groseille de Möhner-Denigès par traitement avec quelques gouttes d'une solution d'éthanal en présence d'acide sulfurique. La présence de la tyrosine indique une dégradation plus profonde. (Bb. 7).

Le liquide séparé des matières albuminoïdes donne aussi avec le brome une légère coloration violacée semblable à celle qu'on obtient avec les liquides ayant subi une digestion trypsique, coloration attribuée au tryptophane. Il n'est donc pas douteux que le lait a eu ses matières albuminoïdes touchées par les microbes qui ont vécu à son contact. Quelles sont les diastases sécrétées par chacun d'eux, et l'activité de la

sécrétion ? C'est ce que nous avons essayé de rechercher par les quelques expériences suivantes.

Comme pour la recherche de la lactase, les essais ont été faits sur le képhir et sur les quatre microbes.

Nous avons préparé une macération aussi concentrée que possible en épuisant par l'eau la matière desséchée dans le vide et broyée avec sable et poudre de verre. L'épuisement se fait à l'étuve à la température de 20° pendant 24 heures, on additionne de 1 % de fluorure de sodium. Cet antiseptique nous a paru donner des macérations plus actives que celles obtenues avec le toluène ou le thymol.

L'action des diastases a été suivie par la méthode de Mette légèrement modifiée.

Action sur la caséine. — Un tube à essai de un demi-centimètre de diamètre est rempli de lait écrémé additionné d'une quantité convenable de présure, on fait coaguler et on stérilise par tyndallisation à 60°

Ce tube est passé dans un bouchon à trou et renversé à l'intérieur d'un autre tube plus grand qui contient la macération comme l'indique le schéma ci-contre. Après l'expérience on mesure la longueur de gélatine liquéfiée dans le tube O.

D'autre part, avant l'expérience, on a dosé le résidu sec de la macération : extrait 1 ; le résidu sec après coagulation par la chaleur et filtration a été dosé : extrait 2 ; la différence α entre 1 et 2 donne les albuminoïdes coagulables sans qu'il soit nécessaire de laver et de sécher le précipité, ce qui souvent est très difficile avec certaines macérations.

Après l'expérience, on dose l'extrait sec de la macération mise à l'étuve sans caséine : extrait fait après coagulation par la chaleur de la matière albuminoïde restant après filtration : extrait 3 ; la différence entre 3 et 2 donne les albuminoïdes solubilisés par l'action de la macération sur elle-même β .

On dose le résidu sec après coagulation par la chaleur et filtration d'une macération qui a été en contact avec la caséine : extrait 4 ; la différence entre 4 et 3 donne la caséine solubilisée. La différence δ entre α et β donne les albuminoïdes de la macération inattaqués encore coagulables, restant après l'expérience.

Action sur la gélatine. — La caséase ayant une action digestive très marquée sur la gélatine, nous avons remplacé la caséine coagulée par de la gélatine. Nous avons employé le même dispositif.

Les résultats de ces expériences consignés dans le tableau



RÉSUMÉ DE L'ACTION SUR LES ALBUMINOÏDES

AVANT L'EXPÉRIENCE

Extrait 1 :	Résidu soluble fixe...	}	Différence entre l'Extrait 1 et 2	} α Albumino coagulab
Extrait sec de la macération contient.....	Matières albuminoïdes coagulables			
Extrait 2 :		}	Différence entre l'Extrait 2 et 3	} β Albumino solubilis provenant albuminoï coagulable la macéra
Extrait sec de la macération après coagulation des al- buminoïdes par la chaleur et filtration.....	Résidu soluble fixe ...			

APRÈS L'EXPÉRIENCE

Extrait 3 :		}	Différence entre l'Extrait 3 et 4	} γ Caséine solubilis ou gélatine solubilis
Tube témoin : Macération seule non bouillie.....	Résidu soluble fixe ...			
Extrait 4 :		}	Différence entre l'Extrait 3 et 4	} δ Albuminoïdes solubili- sées provenant des albuminoïdes de la macération.....
Extrait sec de la macération sans caséine ni gélatine, après coagulation des al- buminoïdes par la chaleur et filtration.....	Albuminoïdes solubili- sées provenant des albuminoïdes de la macération.....			
Extrait 4 :		}	Différence entre l'Extrait 3 et 4	} δ Albuminoïdes solubili- sées provenant des albuminoïdes de la macération caséine (tube 1) ou gélatine solubilisée (tube 2).
Extrait sec de la macération avec caséine ou gélatine, après coagulation des al- buminoïdes par la chaleur et filtration.....	Albuminoïdes solubili- sées provenant des albuminoïdes de la macération caséine (tube 1) ou gélatine solubilisée (tube 2).			

La différence δ entre α et β donne les albuminoïdes de la
la macération inattaquées, encore coagulables, restant après
l'expérience.

SUBSTANCE EXAMINÉE		Réaction du Milieu	α	β	γ		δ	Millimètres solubilisés	
			Albuminoïdes coagulables avant l'action	Albuminoïdes solubles après l'action	Caséine solubilisée	Gélatine solubilisée	Albuminoïdes coagulables restant après l'action	Caséine	Gélatine
Grains de Képhir..	Macération crue.....	Acide.....	4.30	0	0.20	0.25	4.30	6	8
	Témoin bouilli à 100°....	H Cl 5 o/oo..	4.32	0	0	0	4.32	0	0
	Macération crue.....	Alcaline....	4.40	0.40	0.05	0.085	4	2	1
	Témoin bouilli à 100°....	CO ³ Na ² 3 o/oo	4.35	0	0	0	4.35	0	0
Levure....	Macération crue.....	Acide..	3.40	3.40	0.15	0.17	0.30	4.50	6
	Témoin bouilli à 100°....	H Cl 5 o/oo..	3.50	0	0	0	3.50	0	0
	Macération crue.....	Alcaline....	3.70	3.54	0.12	0.11	0.16	3	2
	Témoin bouilli à 100°....	CO ³ Na ² 3 o/oo	3.90	0	0	0	3.90	0	0
Torula....	Macération crue.....	Acide.....	4.70	4.40	0.12	0.19	0.60	5	6
	Témoin bouilli à 100° ..	H Cl 5 o/oo..	4.35	0	0	0	4.35	0	0
	Macération crue.....	Alcaline....	4.65	2 20	0.09	0.07	2 45	2	1
	Témoin bouilli à 100°....	CO ³ Na ² 3 o/oo	4.75	0	0	0	4.75	0	0
Bacille....	Macération crue.....	Acide.....	0.20	0	0.10	0.08	0.20	2	3
	Témoin bouilli à 100°....	H Cl 5 o/oo..	0.23	0	0	0	0.23	0	0
	Macération crue.....	Alcaline....	0.29	0.002	0	0	0.288	0	0
	Témoin bouilli à 100°....	CO ³ Na ² 3 o/oo	0.25	0	0	0	0.25	0	0
Micrococcus	Macération crue.....	Acide.....	0.18	0.08	0.12	0.095	0.10	3	3
	Témoin bouilli à 100°....	H Cl 5 o/oo..	0.15	0	0	0	0.15	0	0
	Macération crue.....	Alcaline....	0.19	0.003	0	0	0.187	0	0
	Témoin bouilli à 100°....	CO ³ Na ² 3 o/oo	0.16	0	0	0	0.16	0	0

La liquéfaction de la gélatine observée dans l'expérience ci-dessus paraît en contradiction avec l'essai mentionné à la morphologie où la liquéfaction ne s'est produite qu'incomplètement. Ceci indique que la diastase ne doit pas diffuser en dehors de la cellule ou très peu et quelle ne peut être mise en liberté que par dessiccation et déchirement des cellules. On comprend alors facilement pourquoi le képhir contient très peu de peptones et de caséine dissoute.

ci-contre, indiquent donc que les microbes du képhir paraissent sécréter peu de diastases ou tout au moins que les diastases sécrétées sont peu actives, la dégradation effectuée sur les matières albuminoïdes étant faible.

Les résultats des expériences qui viennent d'être précédemment décrites, paraissent établir que le lait soumis à l'action des germes retirés du grain de képhir contient de faibles quantités de diastases semblables à celles sécrétées par le tube digestif de l'homme.

Les matières composantes du lait, notamment la caséine, sont peu dégradées et peu digérées par ces microbes, sous l'action des diastases qu'ils sécrètent.

Le képhir, d'autre part, paraît, d'après les nombreuses observations cliniques, donner de meilleurs résultats que le lait au point de vue digestibilité dans certains troubles de l'appareil digestif.

Pouvait-on attribuer cette plus facile assimilation à la simple ébauche de digestion commencée par nos germes ? Pouvait-on mettre en parallèle la puissance de nos microbes avec celle des glandes digestives ?

Pour examiner cette question et y répondre, il nous a paru intéressant d'étudier *in vitro*, l'action de ces glandes sur le lait espérant trouver dans cette étude la cause de facile digestibilité du képhir.

Ce sont ces expériences que nous allons rapporter pour terminer notre travail.

ACTION DE LA MUQUEUSE D'ESTOMAC DE PORC SUR LE LAIT

La muqueuse de plusieurs estomacs de porc, recueillie aussitôt après l'abattage et lavée à l'eau stérilisée pour éliminer le plus possible les germes microbiens, est réduite en pulpe au broyeur. Une partie de cette muqueuse est ajoutée à raison de 100 grammes par litre dans du lait stérilisé en quantité suffisante pour les différents essais et dosages ; on malaxe très fortement pour obtenir une émulsion homogène. (Ballon A, tableau page 78).

Une autre portion est ajoutée à du sérum de lait stérilisé, séparé de sa matière albuminoïde par coagulation en milieu acide, filtration et neutralisation. (Ballon B, tableau page 78).

Lorsque ces liquides sont bien homogènes, avant de répartir en ballons de un litre pour expérience, on procède aux dosages des matières albuminoïdes de la façon suivante pour avoir les résultats les plus concordants possible et éviter les causes d'erreur qui proviendraient de la difficulté de répartir la matière albuminoïde coagulée après addition de 5 cc. d'acide nécessaires pour la digestion.

Matières albuminoïdes avant l'action (*dosage*) —

Lorsque la pulpe de muqueuse forme avec le lait une émulsion bien homogène on fait quatre prises de 100 cc. pour le dosage, on acidifie chaque prise, on chauffe et recueille les précipités sur des filtres lavés à l'eau et à l'alcool ; on les dégraisse par l'éther au Soxhlet, sèche et pèse. Si les quatre prises sont de poids très voisins, on considère le liquide comme homogène et le dosage exact.

Cette méthode nous a donné les résultats ci-dessous consignés d'autre part dans le tableau page 78.

I.	BALLON A (liquide primitif)	BALLON B (liquide primitif)
1 ^{re} Prise	5,90 pour 100 cc.	2,26 pour 100 cc.
2 ^{me} »	6,00 »	2,28 »
3 ^{me} »	5,72 »	2,10 »
4 ^{me} »	5,78 »	2,32 »
Total	23,40	8,96
Moyenne	5,85	2,24
Matière albuminoïde coagulable par la chaleur	58,50 par litre	22,40 par litre.

Albumoses (*dosage*). — Tout le liquide provenant de la filtration et du lavage du coagulum des 100 cc. de l'opération précédente est traité par 80/100 de sulfate d'ammoniaque et porté à l'ébullition. On filtre sur un filtre taré, on lave d'abord avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque puis à l'alcool bouillant ; on sèche à 100° et pèse.

	Prise 1	Prise 2	Prise 3	Prise 4
	1 ^{er} filtre	2 ^{me} filtre	3 ^{me} filtre	4 ^{me} filtre
Pesée du filtre.....	0,379	0,418	0,397	0,388

D'autre part il faut déterminer la quantité de sulfate d'ammoniaque qui imprègne le filtre. A cet effet le filtre tout entier est traité par l'eau chaude et les eaux de lavage sont amenées au volume de 100 cc. On en prélève 20 cc. dans lesquels on dose l'acide sulfurique à l'état de sulfate de baryum.

	1 ^{er} filtre	2 ^{me} filtre	3 ^{me} filtre	4 ^{me} filtre	
Double pesée {	Poids de la capsule vide.	8,020	3,392	3,562	5,079
	» avec sulfate de baryum .	7,960	3,320	3,495	5,015
	Sulfate de baryum pour 20 cc.	0,060	0,072	0,067	0,064
	Sulfate de baryum pour 100 cc. c'est-à-dire tout le filtre, 5 fois plus	0,300	0,360	0,335	0,320

Le poids moléculaire du sulfate d'ammoniaque étant 132,20 et celui du sulfate de baryum 233,50, le coefficient de calcul du sulfate d'ammoniaque est de $\frac{132,20}{233,50} = 0,5661$.

Poids du sulfate d'ammoniaque :

1 ^{er} filtre.....	$0,5661 \times 0,300 = 0,169$
2 ^{me} filtre.....	$0,5661 \times 0,360 = 0,203$
3 ^{me} filtre.....	$0,5661 \times 0,335 = 0,189$
4 ^{me} filtre.....	$0,5661 \times 0,32 = 0,181$

La différence entre le poids total du filtre et celui de sulfate d'ammoniaque donne le poids d'albumose pour 100 cc.

	1 ^{er} filtre	2 ^{me} filtre	3 ^{me} filtre	4 ^{me} filtre
	0,379	0,418	0,397	0,388
	0,169	0,203	0,189	0,181
Albumoses pour 100 cc...	0,210	0,215	0,208	0,207

$$\text{Moyenne } \frac{0,210 + 0,215 + 0,208 + 0,207}{4} = 0,210$$

Albumoses par litre : $0,210 \times 10 = 2$ gr. 10 dans l'action de l'estomac de porc sur le lait. I. Ballon B. p. 78 (Bb. 33).

Matières albuminoïdes après l'action (*dosage*). —

Après action de la glande, pour le dosage final de la matière albuminoïde coagulable par la chaleur, il était absolument impossible de faire des prises homogènes de 100 cc., le coagulum produit par l'acide ajouté pour l'expérience étant difficile à dissocier. Le litre de liquide contenu dans le ballon d'essai est chauffé ; après coagulation par la chaleur, pour avoir des masses de précipité moins volumineuses, on jette le tout sur quatre grands filtres de papier très peu serré. On lave à l'alcool, à l'éther, sèche et pèse comme ci-dessus.

II. (tableau p. 78).	BALLON A	BALLON B
Filtre 1.....	20,30	5,15
Filtre 2.....	10,05	4,25
Filtre 3.....	13,10	6,82
Filtre 4.....	12,85	2,28
Matière albuminoïde coagulable	56,30	18,50
(contenue dans 1 litre)	<u>56,30</u>	<u>18,50</u>

Les albumoses sont ensuite dosés, comme ci-dessus, sur une partie du filtrat obtenu dans le dosage des matières albuminoïdes coagulables par la chaleur.

Peptones. — Les peptones et polypeptides ont été calculés en prenant la différence entre la somme des matières albuminoïdes coagulables par la chaleur, en milieu acide, et les albumoses précipitables par le sulfate d'ammoniaque, avant l'action, et la même somme après l'action.

EXEMPLE III. A. (tableau p. 78) :

I. A.	Albuminoïdes coagulables par	
(avant expérience)	la chaleur.....	58,50
	Albumoses.....	3,13
	Total.....	61,63
III. A.	Albuminoïdes coagulables par	
après expérience)	la chaleur.....	49,25
	Albumoses.....	5,90
	Total.....	55,15
	Peptones et polypeptides.....	<u>6,48</u>

ACTION DE L'ESTOMAC DE PORC SUR LE LAIT

		Durée de l'expérience	1 Albuminoïdes coagulables par la chaleur en milieu acide par litre	2 Albumoses précipitables par le sulfate d'ammoniaque par litre	3 Peptones et Polypeptides (par différence par litre
I	A Estomac cru avec lait.	0 heure	58,50	3,13	0
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		22,40	2,10	0
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		58,30	3,50	0
II	A Estomac cru avec lait.	2 heures temps de la digestion stomacale (GAUCHER)	56,30	5,30	traces
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		19,50	4,60	»
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		58,25	3,40	0
III	A Estomac cru avec lait.	6 heures temps de la digestion stomacale (LAMBLING)	49,25	5,90	6,48
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		9,90	12,10	2,50
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		58,20	3,33	0
IV	A Estomac cru avec lait.	12 heures	32,12	20,10	9,41
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		8,50	12,70	3,30
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		58,10	3,45	0
V	A Estomac cru avec lait.	24 heures	29,13	15,22	17,28
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		4,70	6,75	13,05
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		57,90	3,30	0
VI	A Estomac cru avec lait.	72 heures	15,20	14,20	32,23
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		0,20	1,50	22,80
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		58	3,40	0

Au bout de quelques heures, on s'aperçoit que le coagulum qui se trouve dans les ballons où une action se produit, semble

se modifier et se solubiliser. Après 24 heures, le liquide devient très visqueux. La matière visqueuse obtenue ne traverse pas les filtres en porcelaine qu'elle colmate presque complètement, ni les filtres en papier très serré.

Le ballon A sert à mesurer l'action de l'estomac sur le lait. Comme la glande produit, *in vitro*, une digestion sur son propre tissu, nous avons disposé un ballon B contenant la même quantité de muqueuse que A, mais le lait a été remplacé par du sérum préparé avec le même lait que celui de A, dont on a séparé la caséine par précipitation par la chaleur, en milieu acide, et qui a été neutralisé après filtration.

Le ballon B permet dans une certaine mesure de connaître les quantités de matières albuminoïdes venant de la glande et l'action des sucs digestifs sur cette matière albuminoïde.

Le ballon C contenant l'organe bouilli sert à établir que l'action est dûe à un produit inactif après l'action de la chaleur à 100° (diastase).

La colonne 1 indique les quantités de matières albuminoïdes non transformées dans chacun des ballons.

La colonne 2 donne les quantités d'albumoses précipitables par le sulfate d'ammoniaque.

La colonne 3 indique les quantités de substances non précipitables par le sulfate d'ammoniaque.

La différence entre les chiffres trouvés, dans chaque colonne, pour A et B, donnent sensiblement l'action sur le lait ; les chiffres de B représentant l'autodigestion de la glande.

Les nombres de la case I indiquent qu'au bout de deux heures (temps admis par Gaucher pour la digestion stomacale) l'estomac n'a pas encore eu une action bien appréciable sur le lait, les albumoses étant encore en très faibles proportions et les substances comprenant les peptones n'étant qu'à l'état de traces. (Bb. 28).

Dans la case II les chiffres indiquent qu'au bout de six heures (temps admis par Lambling pour la digestion stomacale) l'estomac a nettement commencé son action *in vitro*. (Bb. 50).

Les résultats consignés dans les cases III, IV, V et VI, montrent que plus l'action est prolongée plus le travail de la glande avance. Le terme albumose est bien plus vite atteint que le terme peptone et l'action sur le tissu propre de la glande est bien plus rapide que sur la caséine du lait.

ACTION DU TISSU DU PANCRÉAS DE PORC SUR LE LAIT ET LE KÉPHIR

Nous avons pris 400 grammes de tissu de pancréas recueilli aussi aseptiquement que possible avec des instruments stériles, sur des animaux en pleine digestion. Pour avoir des tissus semblables, nous avons pris plusieurs glandes, les avons passées au broyeur stérilisé et fait une bouillie homogène pour la répartir dans les divers ballons utilisés dans nos expériences et procédé aux dosages comme précédemment.

La glande a été mise dans du lait fluoruré 1 % et écrémé pour ne pas être gêné par les matières grasses et les actions de la lipase sur les graisses. (Ballon A).

Cet échantillon est mis à l'étuve à 40° en même temps qu'un témoin B contenant de la glande crue avec sérum de lait écrémé et fluoruré à 1 % pour déterminer l'action de la glande sur elle-même ; et un autre témoin C renfermant de la glande chauffée à 100° et du lait.

Au bout de douze heures d'action, le lait prend un aspect granuleux, mais à grains peu visibles ; il semble qu'il s'est produit une coagulation extrêmement fine ; puis ces grains disparaissent, le lait devient de moins en moins opaque et en quarante-huit heures il présente l'aspect d'un liquide jaune citrin comme le bouillon de bœuf. Si on laisse l'expérience continuer, on voit apparaître un précipité blanchâtre donnant la réaction de la tyrosine. (v. p. 70).

Comme pour l'expérience avec la muqueuse de l'estomac, le ballon A sert à mesurer l'action du pancréas sur le lait. La glande pancréatique produit elle aussi comme l'estomac une digestion de la matière albuminoïde de son propre tissu. Le ballon B préparé avec la même quantité de glande que dans A et du sérum du même lait, permet de connaître les quantités de matières albuminoïdes venant de la glande et l'action des sucs de cette glande sur sa propre matière albuminoïde. Le ballon C contenant l'organe bouilli sert à prouver que l'action digestive est due à un produit inactif après action de la chaleur à 100°.

Les chiffres des colonnes 1, 2, 3, représentent les mêmes substances que dans l'expérience avec la muqueuse de l'estomac.

		Durée de l'expérience	1 Albuminoïdes coagulables par la chaleur en milieu acide par litre	2 Albumoses précipitables par sulfate d'ammoniaque par litre	3 Peptones et acides aminés (par différence) par litre
I	A Pancréas cru avec lait.	0 heure	47,20	3,75	0
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		18,40	2,37	0
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		46,05	3,92	0
II	A Pancréas cru avec lait.	2 heures	45,20	4,10	1,65
	B » cru avec sérum de lait (1 ^{er} témoin)		15,20	3,30	2,27
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		47	3,70	0
III	A Pancréas cru avec lait.	6 heures	18,10	18,25	14,60
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		3,75	8,40	8,61
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		46,12	3,50	0
IV	A Pancréas cru avec lait.	12 heures	2,92	6	42,03
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		0,45	2,10	18,21
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		47,30	3,25	0
V	A Pancréas cru avec lait.	48 heures	0	2,10	48,85
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		0	0,20	20,57
	C » bouilli avec lait. (2 ^{me} témoin)		47,10	3,90	0

Les résultats consignés dans la case I montrent qu'au bout de six heures l'action de la glande est encore faible. Ceux des cases suivantes prouvent que cette action est proportionnelle à la durée du contact.

Le temps de digestion est moins long que pour l'estomac. Au bout de quarante-huit heures toute la matière albuminoïde précipitable par la chaleur a disparu et le terme peptone est au moins atteint ou dépassé si on en juge par les chiffres de la colonne 3.

Nous avons repris ensuite cette expérience avec du lait ayant subi pendant quarante-huit heures, l'action digestive de l'estomac de porc, et d'autre part avec le képhir de deux jours acide et neutralisé. Cette dernière expérience a été faite pour vérifier si l'acidité du képhir est un obstacle à sa digestion.

Les résultats ont été les suivants :

Action du Pancréas sur le lait
digéré par la muqueuse de l'estomac pendant 48 heures

		Durée de l'expérience	1 Albuminoïdes coagulables par la chaleur en milieu acide par litre	2 Albumoses précipitables par le sulfate d'ammoniaque par litre	3 Peptones et acides aminés (par différence) par litre
I	A Pancréas cru avec lait ayant subi l'action de l'estomac.	0 heure	34,20	9,10	20,10
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		17,20	2,70	0
	C » bouilli avec lait ayant subi l'action de l'estomac. (2 ^{me} témoin)		34,30	8,70	19
II	A Pancréas cru avec lait ayant subi l'action de l'estomac.	48 heures	0	1,85	58,55
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		0	0,18	19,72
	C » bouilli avec lait ayant subi l'action de l'estomac. (2 ^{me} témoin)		34,30	8,70	19

Les ballons A. B. C. servent aux mêmes vérifications que dans les expériences qui précèdent.

La case I indique l'état de la matière au début de l'expérience : matières albuminoïdes coagulables restant après l'action de l'estomac, albumoses et peptones produites par cette action stomacale et qui vont subir la digestion du pancréas.

La case II indique le travail exécuté par le pancréas en 48 heures sur les matières de la case I.

La colonne 1 montre que les matières albuminoïdes du lait et de la muqueuse de l'estomac non digérées par ce dernier ainsi que celles de la glande du pancréas surajoutées, sont dissoutes au bout des 48 heures et que presque toute la tota-

lité de la substance albuminoïde a dépassé le terme albumose et atteint l'état de substance non précipitable par le sulfate d'ammoniaque (Peptones, acides aminés).

Ce tableau indique nettement que le lait est complètement digéré par le pancréas comme l'indiquait la case V de la page 81.

**Action du Pancréas
sur le Képhir de 48 heures neutralisé**

		Durée de l'expérience	1 Albuminoïdes coagulables par la chaleur en milieu acide par litre	2 Albumoses précipitables par le sulfate d'ammoniaque par litre	3 Peptones et acides aminés (par différence)
I	A Pancréas cru avec képhyr.	0 heure	58,10	5,60	1,10
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		23,30	3,10	0
	C » bouilli avec képhyr... (2 ^{me} témoin)		57,02	4,80	0,90
II	A Pancréas cru avec képhyr.	36 heures	0,19	4,60	60,01
	B » cru avec sérum de lait. (1 ^{er} témoin)		0,90	1,30	24,20
	C » bouilli avec képhyr... (2 ^{me} témoin)		57,02	4,80	0,90

Les chiffres de la case I indiquent l'état des matières albuminoïdes du képhir neutre mélangé avec la glande elle-même au début de l'expérience.

Les chiffres de la case II donnent l'état de ces matières après 48 heures de contact.

Les colonnes 1, 2, 3, indiquent que la digestion peut être considérée comme complète, dans A et B, les albuminoïdes précipitables par la chaleur ayant presque complètement disparu.

Action du Pancréas sur le Képhir de 48 heures acide (Acidité 6,9 ‰ Acide lactique)

		Durée de l'expérience	1 Albuminoïdes coagulables par la chaleur en milieu acide par litre	2 Albumoses précipitables par le sulfate d'ammoniaque par litre	3 Peptones et acides aminés (par différence) par litre
I	A Pancréas cru avec képhir..	0 heure	60,80	6,10	1,60
	B » cru avec sérum de lait acidifié à 6,9 ‰ acide lactique (1 ^{er} témoin)		25,35	3,75	0,60
	C » bouilli avec képhir... (2 ^{me} témoin)		59,90	5,80	1,20
II	A Pancréas cru avec képhir..	48 heures	2,70	8,60	57,20
	B » cru avec sérum de lait acidifié à 6,9 ‰ acide lactique (1 ^{er} témoin)		0,92	4,38	23,80
	C » bouilli avec képhir... (2 ^{me} témoin)		59,90	5,80	1,20

Les nombres de la case II démontrent qu'au bout de 48 heures les matières albuminoïdes sont moins dégradées que dans le képhir neutralisé de l'expérience précédente qui n'a duré que 36 heures.

L'acidité du milieu ralentit légèrement l'action de la trypsine, la digestion au bout de 48 heures en milieu acide est visiblement moins avancée qu'au bout de 36 heures en milieu neutre. Cependant cette acidité n'est pas un obstacle absolu à la digestion, puisque les chiffres de la colonne 3 case II indiquent que la matière albuminoïde passe presque complètement à l'état de peptones et d'acides aminés.

COMPARAISON DE
L'ACTION DIGESTIVE DES MICROBES DU KÉPHIR
ET DES EXTRAITS D'ORGANES
SUR LA MATIÈRE ALBUMINOÏDE DU LAIT

Si nous comparons les résultats consignés dans le tableau suivant où sont rapportées les actions digestives du képhir sur la matière albuminoïde du lait, nous voyons que dans le képhir jeune, la matière azotée est à peine touchée. Le lait attaqué par le suc digestif de l'estomac n'a que le tiers de sa caséine solubilisée, tandis que le pancréas a une action complète.

Expérience faite sur un lait renfermant : 32 gr. 10 de caséine par litre

SUBSTANCES AGISSANTES	DURÉE DE L'ACTION	Matières albuminoïdes solubilisées par litre de lait
Microbes du képhir	72 heures	0,92
	18 mois	10,30
Estomac cru avec lait...	72 heures	10,90
Pancréas cru avec lait ..	48 »	30,10

N.-B. — Pour le pancréas et l'estomac de porc, les quantités de matières albuminoïdes solubilisées ont été obtenues en tenant compte de l'autodigestion produite dans des ballons témoins contenant des glandes et du sérum de lait.

On peut conclure que par comparaison avec l'action des sucs stomacal et pancréatique, *in vitro*, les microbes du képhir ont un effet presque nul sur la caséine dans le temps de préparation du képhir tel qu'il est consommé.

Pour terminer notre comparaison des diastases des glandes avec celles des microbes du képhir, nous avons procédé à la recherche de la lactase dans les extraits d'estomac et de pancréas de porc.

RECHERCHE DE LA LACTASE DANS LES EXTRAITS D'ESTOMAC ET DE PANCRÉAS DE PORC

Pour rechercher la lactase, nous avons préparé des solutions lactosées semblables à celles qui nous avaient servi pour constater la présence de ce ferment dans les germes de képhir (pages 60-63).

Les résultats ont été résumés dans les tableaux suivants :

TUBE N° 1 TÉMOIN		TUBE N° 2 TÉMOIN .	
Macération	50 cc.	Macération bouillie	50 cc.
Lactose.....	0 gr.	Lactose.....	0 gr.
Toluène	0,5 cc.	Toluène	0,5 cc.
TUBE N° 3		TUBE N° 4 TÉMOIN	
Macération	50 cc.	Macération bouillie	50 cc.
Lactose.....	5 gr.	Lactose.....	5 gr.
Toluène	0,5 cc.	Toluène ...	0,5 cc.

Les expériences pratiquées comme pour le képhir ont donné :

		MÉTHODE polarimétrique (déviat. positive)	MÉTHODE DE FISCHER (Osazones insolub.)	MÉTHODE DE ROMJN (Iode fixé en milligr.)
ESTOMAC.	Tube N° 1.	0° 28'	traces	
	» 2.	0° 26'	traces	
	différence.	0° 2'		
	Tube N° 3.	10° 11'	0,02	270 (après l'action)
	» 4.	10° 10'	0,01	267 (avant l'action)
	différence.	0° 1'	0,01	3.—
PANCRÉAS	Tube N° 1.	0° 31'	traces	
	» 2.	0° 28'	traces	
	différence.	0° 3'		
	Tube N° 3.	10° 18'	0,16	278 (après l'action)
	» 4.	10° 15'	0,12	277 (avant l'action)
	différence.	0° 3'	0,04	1.—

Ces trois méthodes expérimentales prouvent que les extraits d'organes (estomac et pancréas) n'hydrolysent pas le sucre de lait et par conséquent ne secrètent pas de lactase comme l'ont déjà démontré Hamburger et Hekma pour le suc intestinal de l'homme et Dastre pour le suc intestinal du chien. (Bb, 38-49).

CONCLUSIONS

Les quelques expériences et observations que nous avons pu faire au cours de notre travail indiquent que les germes isolés du grain de képhir de Tiflis peuvent produire une fermentation alcoolique du glucose, du galactose et du saccharose, une fermentation lactique du lactose, une fermentation visqueuse de ce dernier sucre.

Pour avoir une semence de képhir active dont les grains se reproduisent, croissent et donnent de l'alcool, de l'acide lactique, de la matière visqueuse, il faut qu'elle contienne la levure, le bacille et le micrococcus. La torula trouvée ne paraît pas jouer un rôle très important ; peut-être, par les voiles qu'elle forme à la surface du liquide, contribue-t-elle à protéger le milieu contre l'oxygène de l'air et favorise-t-elle le développement du bacille et du micrococcus qui paraissent préférer les milieux peu exposés au large contact de l'air.

En résumé, le bacille donne de l'acide lactique, il dédouble le lactose et permet à la levure d'attaquer activement le galactose et le glucose et de donner ainsi de l'alcool et de l'acide carbonique qui gazéifie le liquide ; c'est donc lui qui, dans la transformation des éléments du lait, joue le rôle le plus important.

Le micrococcus intervient comme faible ferment lactique et surtout comme ferment visqueux du lactose, il forme pour ainsi dire le grain ou tout au moins la matière agglutinante. Lorsqu'on examine en milieu lactosé et surtout saccharosé une culture de ce microbe en milieu anaérobie, on se rend compte que les zooglées, les flocons de sa culture englobent tous les germes qui peuvent vivre dans ce milieu avec lui. Il crée en un mot le grain qui est retenu ensuite dans la filtration grossière de la culture. L'état de viscosité qu'il produit par son action sur le sucre donne de plus au coagulum de caséine formé par lui ou par le bacille « l'aspect ténu et gluant que l'on voit dans le képhir », il donne au liquide un état physique qui ressemble assez à celui du lait après traitement *in vitro* par la muqueuse d'estomac de porc, mais l'état physique visqueux n'est pas dû à la même substance : dans le képhir c'est le sucre qui a été modifié, dans l'estomac c'est la matière azotée qui a été rendue

visqueuse. Les microbes du képhir sont sans action sur la matière grasse du lait.

Au point de vue de la digestion de la matière azotée, l'action des germes étudiés n'est en rien comparable à celle des glandes de l'estomac et du pancréas. Les microbes du képhir attaquent très faiblement la caséine du lait, les quantités de peptones formées sont presque négligeables et l'action de la caséase presque nulle. La levure et la torula sembleraient plus actives que le bacille et le micrococcus, mais l'action de leur caséase est presque arrêtée par la production de l'acide lactique des deux autres germes. Le képhir apparaît donc surtout comme une boisson lactique, par conséquent active au point de vue antiseptique contre les fermentations secondaires intestinales. La matière albuminoïde n'est presque pas dégradée et l'action de ces germes n'est en rien comparable à celle des sucs d'organes : estomac et pancréas agissant *in vitro*. Les faibles quantités de lipase, caséase, pepsine que secrètent nos trois microbes ne pourraient en rien suppléer les sucs digestifs.

Cependant l'état visqueux du képhir le rapproche de l'état physique du lait digéré par l'estomac, sa caséine est dans un état très voisin au point de vue division et fluidité de la caséine soumise à l'action du suc stomacal. Il est possible que cet état physique facilite l'action du pancréas. On peut même aussi envisager l'hypothèse que du képhir non touché par du suc stomacal inactif, traversant le duodénum, aura par sa viscosité et son acidité les mêmes effets sur l'excitation de la glande pancréatique que du lait digéré depuis plusieurs heures par l'estomac. L'état de division de la caséine dans le képhir ne peut que favoriser l'action du suc pancréatique. Les résultats de nos expériences de digestion *in vitro* par l'estomac indiquent comme l'avait établi Gaucher qu'au bout de deux heures la matière albuminoïde du lait est peu ou presque pas touchée.

Au contraire, si on laisse en contact six heures, comme le fait Lambling, une partie de la caséine est digérée et peptonisée. Ce qui semble indiquer que l'action stomacale est lente et que les résultats différents trouvés par les auteurs tiennent surtout à la différence de durée de leurs essais.

Néanmoins la digestion de la caséine du lait apparaît surtout comme une digestion pancréatique, et comme le képhir se rapproche plutôt d'un lait ayant subi un commencement d'action stomacale, on peut dire qu'il s'agit d'une boisson préparée pour une digestion pancréatique.

Les sucs pancréatiques et le suc stomacal ne paraissent pas avoir d'action sur le lactose.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ADAMETZ..... *Levures de Lactose.*
Rapporté dans le *Traité de Microbiologie* de
Duclaux, T. III, p. 688. (1900).
- 2 ARNAULD..... *Le Leben d'Algérie.*
Thèse de Doctorat en Pharmacie (Montpellier,
1899).
- 3 BARY..... *Le Képhir.*
Rapporté dans le *Traité de Microbiologie* de
Duclaux, T. IV, p. 408. (1901).
- 4 BÉCHAMP (A.)... .. *Coagulation du lait. — Alcool et acide acétique
normaux dans le lait.*
“Les Microzymas”, Bailliére & Fils. Pp. 160 à
à 170 (1883).

Le rôle de la craie dans la fermentation lactique.
“Les Microzymas”, Bailliére & Fils, p. 171
(1888).
- 5 BECQUET (M.)..... *Contribution à l'étude de l'action du bacille bul-
gare sur la flore intestinale.*
Thèse de Doctorat en Pharmacie (Paris 1914).
- 6 BEJERINCK..... *Levures de Képhir.*
Archives néerlandaises, T. XXIII, p. 428 (1889).
- 7 BERTHELOT & JUNGFLEICH *Traité de Chimie organique.* Dunod, Paris, T. II,
4^{me} édition (1904).
La tyrosine ... p. 879.
Acide lactique. p. 231.
Les peptones.. p. 1292.
La tryptophane p. 1275.
- 8 BERTRAND & WEISWELER *Action du ferment bulgare sur le lait.*
Annales de l'Institut Pasteur, T. XX, pp. 977-
990 (1905).
- 9 BOECKOUT..... *Ferments visqueux.*
Centralblatt für Bakteriologie, T. VI, p. 161
(1900).
- 10 BOULLANGER (E.)..... *Caséase des levures.*
Annales de l'Institut Pasteur, T. X, p. 593
(1896).
- 11 BOURQUELOT (E.)..... *Les Microbes dans la fermentation lactique du
lait.*
Journal de Pharmacie et de Chimie, T. XIII,
p. 193 (1886).

- 12 BOURQUELOT & HÉRIS-*La Lactase*.
SEY (H.)..... Journal de Pharmacie et de Chimie, T. XVIII,
pp. 151-158 (1903).
- 13 BOUTRON & FRÉMY..... *Recherches sur la fermentation lactique*.
Annales de Chimie et de Physique, T. II,
p. 291 (1840).
- 14 BOUTROUX..... *La fermentation lactique*.
Comptes-rendus de l'Académie des Sciences,
T. LXXXVI, p. 605 (1878).
- 15 BRACHIN..... *La Lactase*.
Journal de Pharmacie et de Chimie, T. XVIII,
p. 195 (1904).
- 16 BRAUTIGAM..... *Le Képhir*.
Pharmaceutische Centralhalle, T. XXIII, p. 427
(1891).
- 17 CAMUS..... *La Lipase*.
Bulletin de la Société de Biologie, T. L, pp.
192-230 (1897).
- 18 COUVREUR... *Les Albuminoïdes du lait et la Caséification*.
Bulletin de la Société de Biologie, T. LXI,
p. 512 (1906).
- 19 DASTRE..... *Recherche de la Lactase dans le suc intestinal
du chien*.
Rapporté dans Précis de Biochimie de Lam-
bling, p. 167 (Ed. Masson, 1911).
- 20 DIENERT..... *Sur la fermentation du Galactose et l'accoutu-
mance des Levures à ce sucre*.
Annales de l'Institut Pasteur, T. XIV, p. 440
(1900).
- 21 DOMBROWSKI..... *Les Levures dans le lait (Torula lactis γ)*.
Centralblatt für Bakteriologie, T. XXXVIII,
pp. 42-45 (1910).
Annales de l'Institut Pasteur, T. IX, p. 46
(1911).
- 22 DUCLAUX..... *Traité de Microbiologie*. Masson, Paris.
Acides volatils, recherche et dosage, T. III,
p. 384 (1900).
Alcool, recherche et dosage de petites quan-
tités, T. III, p. 382 (1900).
Aldéhydes, dosage (méthode de Schiff), T. III,
p. 382 (1900).
Caséase du Pancréas, T. II, p. 623 (1899).
Diastase lactique, T. IV, p. 318 (1901).
Ethers, dosage, T. III, p. 382 (1900).
Fermentation alcoolique, T. III, pp. 263-265
(1900).
Képhir, T. IV, pp. 402 à 412 (1901).
Lactose, fermentation, T. III, pp. 542-682-684
(1900).

- Levures, formation des spores, T. III, pp. 412-419.
 Levures, vie aérobie, vie anaérobie, T. III, pp. 31 à 34 (1900).
 Lipase, T. II, p. 37 (1899).
 Matière visqueuse du lait, T. IV, p. 398 (1901).
 Présure microbienne, T. II, p. 593 (1899).
 Le Képhir, « Principes de laiterie », A. Colin, pp. 85 à 107 (1895).
 Actuellement chez Geisler, 4, rue de Médecis.
- 23 DUCHACEK (F.)..... *Sur une soi-disant variation biochimique du ferment lactique bulgare.*
 Compte-rendus de l'Académie des Sciences, T. CLVII, p. 1095 (1913).
- 24 FERNBACH & SCHOEN.... *Sur la production du lévulose par voie biochimique.*
 Compte-rendus de l'Académie des Sciences, T. CLV, p. 84 (1912).
- 25 FERNI *Diastase dissolvante de la gélatine. — Trypsine.*
 Rapporté dans le Traité de Microbiologie de Duclaux, T. II, p. 618.
- 26 FISCHER..... *La Lactase.*
 Journal de Physique et de Chimie, T. XVIII, p. 197 (1904).
 Ber. d. d. Chem. Gesellschaft, T. XXVII, p. 2481 (1894).
- 27 FREUDENREICH..... *Bacillus Caucasicus. — Saccharomyces Kefir. — Streptocoque a et b du Képhir.*
 Apotheker Zeitung, T. XII, p. 258 (1897),
 Rapporté dans le Traité de Microbiologie de Duclaux, T. IV, p. 404.
Synthèse du Képhir.
 Annales de Micrographie, T. IX, p. 488 (1897).
Fermentation lactique.
 Annales de Micrographie, T. IX, pp. 485-385 (1897).
- 28 GAUCHER..... *Recherches sur la digestion du lait.*
A propos de la digestion gastrique du lait citraté ou fluoruré.
 Bulletin de la Société de Biologie, T. LXVI, p. 743 (1909).
Recherches sur la digestion du lait.
Les diverses phases de la traversée gastrique.
 Bulletin de la Société Biologique, T. XLVI, p. 25 (1909).
- 29 GAYON & SCHIFF..... *Dosage des aldéhydes.*
 Rapporté dans Manuel pratique de l'analyse des alcools et spiritueux, de Ch. Girard et Cuniasse, Masson & Cie, p. 182 (1899).

- 30 GERBER (C.)..... *Fonctionnement des présures aux températures voisines de 0°.*
Bulletin de la Société de Biologie, T. XV,
p. 708 (1908).
Méthode générale de préparation des présures végétales.
Bulletin de la Société de Biologie, T. LXVI,
p. 800 (1909).
Présures des Basidiomycètes.
Bulletin de la Société de Biologie, T. LXVII,
pp. 612-614-616 (1909).
Bulletin de la Société de Biologie, T. LXVIII,
p. 150 (1910).
- 31 GIORADKAWA..... *Sur un procédé rapide pour obtenir des spores dans les levures.*
Bulletin du Jardin Impérial de Botanique de
St-Petersbourg, T. VIII, p. 169 (1909).
- 32 GUERBET.... *Notes sur la fermentation du Yoghourt.*
Compte-rendus de la Société de Biologie,
T. LX, p. 495 (1906).
- 33 GUIART & GRIMBERT... *Précis de diagnostic.* Lamarre & Cie, Paris.
Dosage des Albumoses, 3^e édit., p. 901 (1912).
Action des Bactéries sur le lait, 3^e édit., p. 97
(1912).
Technique bactériologique, 3^e édit., pp. 37-
100 (1912).
Le lait, 3^e édit., pp. 342-357 (1912).
Lactose et lactosazones, 3^e édit., pp. 928-929
(1912).
Glycosazones, 3^e édit., pp. 138-912 (1912).
Recherche de la Trypsine dans les cultures,
p. 77 (1912).
- 34 GRIMBERT..... *Diagnostic des Bactéries par leurs fonctions biochimiques.*
Archives de Parasitologie, T. VII, n° 2, pp.
237 à 302 (1903).
Fermentation anaérobie produite par le " Bacillus Orthobutylicus ".
Annales de l'Institut Pasteur, T. VII, p. 353
(1893).
Sur le Pneumobacille de Friedlander.
Annales de l'Institut Pasteur, T. IX, p. 840
(1895) ; T. X, p. 108 (1896).
- 35 GRIMBERT & LEGROS... *Sur le " Bacillus Lactis aérogènes ".*
Compte-rendus de l'Académie des Sciences,
T. CXXX, p. 1424 (1900).

- 36 GRINZBERG..... *Die chemischen Vorgänge bei der Kumys — und Kefir — gärunq.*
Untersuchungen über Steppen-kumys.
(Les actions chimiques dans la fermentation du Koumys et du Képhir).
(Recherches sur le Koumys des steppes).
Biochemise. Zeitschrift., T. XXI, pp. 24
(1910).
- 37 HAHN & GIÉRET..... *Caséase des Levures.*
Ber. d. d. Chem. Gesellschaft, T. XXXI, p. 200
(1898).
- 38 HAMBURGER & HEKMA. . *Recherche de la Lactase dans le suc intestinal de l'homme.*
Rapporté dans Précis de Biochimie de Lam-
bling, p. 167, Masson Ed. (1911).
- 39 HAMMARSTEN..... *Le Képhir.*
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. IV, p. 403.
- 40 HANRIOT & CAMUS..... *La Lipase.*
Compte-rendus de la Société de Biologie, p. 124
(1897).
- 41 HANSEN (E.-Ch.)..... *Sur la germination des spores chez les saccha-
romyces.*
Compte-rendus des travaux du Laboratoire de
Karlsberg, T. III, p. 10 (1891).
- 42 HÉRY..... *Ferments visqueux.*
Annales de Micrographie, T. IV, p. 1 (1891).
- 43 HERZOG..... *La fermentation lactique.*
Zeitschrift für physiologische Chemie,
T. LXXXVII, p. 381 (1903).
- 44 HOLM & POULSEN..... *Culture de levures sur blocs de plâtre.*
Med. fra Carlsberg Laboratorium, T. II, p. 218
(1883-88).
- 45 JORGENSEN..... *Le Képhir.*
Microorganismen des Gärungsindustrie, Bail-
lière, 6^e édit., p. 92 (1878).
- 46 KAYSER..... *Etudes sur la fermentation lactique.*
Annales de l'Institut Pasteur, T. VIII, pp. 1-
737 (1894).
Levures de Lactose.
Annales de l'Institut Pasteur, T. V (1891).
- 47 KERN..... *“Dispora Caucasica”.*
Bulletin de la Société Impériale des Natura-
listes de Moscou, T. III, pp. 141-177 (1881).
- 48 KLOCHER..... *Les petites quantités d'alcool des fermentations.*
Annales de l'Institut Pasteur, T. IX, p. 1031
(1911) ; T. X, p. 400 (1912).

- 49 KOCH & HOSAEUS..... *La gomme des sucreries.*
Centralblatt für Bakteriologie, T. XVI, p. 225
(1894).
- 50 LAMBLING *La digestion du lait dans l'estomac.*
Précis de Biochimie, Masson, Paris, p. 184
(1911).
- 51 LIEBEN..... *Recherche des petites quantités d'alcool dans les fermentations.*
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. III, p. 9.
- 52 LINDET..... *Le Lait.*
Gauthier-Villars, Paris, pp. 188-190 (1907).
- 53 LINDNER *Diastases dissolvant la gélatine.*
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. II, p. 616.
- 54 LINOSSIER *Dosage de la Pepsine* (Procédé Mette modifié
par l'Auteur).
Précis de Diagnostic. Guiart & Grimbert, 3^e
édit., p. 478 (1912).
- 55 LUTZ & GUEGUEN..... *De l'unification des méthodes de culture pour la
détermination des Mucédinées et des Levures.*
Compte-rendus du Congrès International de
Botanique de l'Exposition Universelle de
Paris, 1900, pp. 415 à 423 (1900).
- 56 MAQUENNE *Le Lactose.*
Les sucres et leurs principaux dérivés. Carré
& Naud, édit., Paris, pp. 29-626-632 (1900);
pp. 617 à 630 (1900).
*Sur l'emploi de Phénylhydrazine à la détermi-
nation des sucres.*
Précis de diagnostic. Guiart & Grimbert, 3^e
édit., p. 912 (1912).
Compte-rendus de l'Académie des Sciences,
T. CXII, p. 799 (1891).
- 57 MARTIN & JACOBY..... *Sur les relations entre l'activité digestive et
l'activité présurante.*
Biochem. Zeitschrift, T. I, pp. 53-74 (1906).
- 58 MAZÉ *Quelques nouvelles races de levures de lactose.*
Annales de l'Institut Pasteur, T. XVII, p. 11
(1903).
- 59 MINISTÈRE DE L'AGRICUL- *Dosage des alcools supérieurs.*
TURE..... Journal Officiel, p. 1335 (1907).
Lait.
Journal Officiel, p. 1879 (1907).
- 60 MÜNTZ..... *Recherche des faibles quantités d'alcool par pro-
duction d'iodoforme.*
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. III, p. 9.

- 61 NICOLAI & ESSAOULOFF.. *Sur le Kéfir, recherches bactériologiques et chimiques.*
Thèse (1895), rapporté dans Molkereizeitung,
p. 283 (1895).
- 62 NOBÉCOURT & MERKLEN.. *Les ferments du lait.*
Bulletin des Sciences Physiques et Chimiques
T. V, p. 367 (1902).
- 63 PASTEUR..... *Mémoire sur la fermentation appelée lactique.*
Annales de Physique et de Chimie, 3^e série,
T. LII, p. 404.
Recherche de l'alcool dans les fermentations.
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. III, p. 6.
- 64 PÉRÉ..... *Fermentation lactique des corps sucrés,*
Annales de l'Institut Pasteur, T. XII, p. 63
(1898).
- 65 PODWYSSOTSKI..... *Le Kéfir, boisson fermentée du lait de vache.*
Kiew (1884).
- 66 POTTEVIN..... *Contribution à l'étude de la fermentation lac-
tique.*
Annales de l'Institut Pasteur, T. XII, p. 49
(1898); T. XVI, p. 65 (1902).
- 67 RICHAUD (A.)..... *Les dérivés du lait : le Kéfir.*
Précis de Thérapeutique, p. 928, Masson, Paris
(1911).
- 68 RICHER..... *De la fermentation lactique du sucre de lait.*
Compte-rendus de l'Académie des Sciences,
T. LXXXVI. p. 550 (1878).
*De quelques conditions de la fermentation lac-
tique.*
Compte-rendus de l'Académie des Sciences,
T. LXXXVIII, p. 750 (1879).
- 69 RIST & KHOURY..... *Etude sur un lait fermenté comestible, le Leben
d'Egypte.*
Annales de l'Institut Pasteur, T. XVI, p. 65
(1902).
Bulletin de la Société de Pharmacie, T. V,
p. 62 (1902).
Journal de l'Industrie laitière, p. 134 (1903).
- 70 RITZER..... *Les fermentations lactiques.*
Pharmaceutische Zeitung, T. XXVI, p. 174
(1891).
- 71 ROMJN..... *Méthode de dosage du sucre aldéhydique.*
Journal de Pharmacie et de Chimie, T. XVIII,
p. 200 (1904).
- 72 SCHEIBLER..... *Sur la Dextrane.*
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. IV. p. 415.

- 73 SONNERAT..... *Composition du Képhir.*
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. IV, p. 410.
- 74 TEXEIRA MENDÈS..... *Gomme des sucreries.*
Journal des Fabricants de sucre (22 avril 1878).
- 75 TOUCHINSKI..... *Composition du Képhir.*
Rapporté dans le Traité de Microbiologie de
Duclaux, T. IV, p. 409.
- 76 TRILLAT & SAUTON..... *Sur le lait amer.*
Compte-rendus de l'Académie des Sciences,
T. CXLIV, p. 913 (1907).
- 77 TUNMANN..... *Etude micrographique du Képhir.*
Journal Suisse de Chimie et de Pharmacie,
T. XLVIII, p. 537 (1910).
- 78 TRAUBE... *Alcools supérieurs.*
Traité de Microbiologie de Duclaux, T. III,
p. 381 (1900).
- 79 UFFELMANN..... *Réactif de l'acide lactique* (Modifié par Berg).
Précis de diagnostic. Guiart & Grimbert, 3^e
édit., p. 460 (1912).
- 80 ULRICH..... *Recherche de la tyrosine.*
Précis de diagnostic. Guiart et Grimbert, 3^e
édit., p. 902 (1912).
- 81 VILLIERS (A.)..... *Alcools supérieurs (Eaux, boissons et alcools).*
Traité des falsifications et altérations alimen-
taires, pp. 390-394, Doin, édit. (1911).

Vu :

Le Président de la thèse,

L. GRIMBERT.

Vu :

Le Directeur de l'Ecole,

H. GAUTIER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.

